

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 24 日 (24.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/06486 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/13, C07K 16/00, 19/00,
C12P 21/08, A61P 35/00, A61K 38/16, 48/00 // 35/12

市青葉区中山5-8-33 Miyagi (JP). 鈴木正徳 (SUZUKI, Masanori) [JP/JP]; 〒981-0933 宮城県仙台市青葉区
柏木2-3-17-211 Miyagi (JP). 津本浩平 (TSUMOTO, Kouhei) [JP/JP]; 〒980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻
字青葉 亀岡住宅13-14 Miyagi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04389

(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 30 日 (30.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 弁理士 重信和男, 外 (SHIGENOBU, Kazuo et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町4丁目6番8号
ダイニチ麹町ビル3階 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, KR, US.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
東北テクノアーチ (TOHOKU TECHNO ARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻字
青葉468番地 Miyagi (JP).

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(72) 発明者; および

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 熊谷 泉
(KUMAGAI, Izumi) [JP/JP]; 〒980-0816 宮城県仙台市
青葉区川内元支倉35 川内住宅9-307 Miyagi (JP). 工藤
俊雄 (KUDO, Toshio) [JP/JP]; 〒981-0952 宮城県仙台

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FUSED PROTEIN WITH ANTITUMOR EFFECT

(54) 発明の名称: 抗腫瘍性融合タンパク質

(57) Abstract: A diabody antibody with multiple specificity relating to an immunotherapy specific to cancer; a process for producing the same; and use thereof. A fused protein binding specifically to both of a tumor cell (in particular, a malignant tumor cell, i.e., a cancer cell) and a cell having cytotoxicity or phagocytosis; fused polypeptides constituting the same; a process for producing the fused protein; and use thereof, in particular, medicinal use as an antitumor agent.

(57) 要約:

癌特異的免疫療法に関連したダイアボディ型多重特異性抗体、その製造法並びにその用途が提供される。腫瘍細胞（特に悪性腫瘍細胞、すなわち癌細胞）と細胞傷害性あるいは食作用を有する細胞との両方に特異的に結合する融合タンパク質、それを構成する融合ポリペプチド類、その製造法並びにその用途、特に抗腫瘍のための医薬用途。

WO 02/06486 A1

明 細 書

抗腫瘍性融合タンパク質

技術分野

本発明は、癌特異的免疫療法に関連したダイアボディ型多重特異性抗体、その製造法並びにその用途に関する。本発明は、腫瘍細胞（特に悪性腫瘍細胞、すなわち癌細胞）と細胞傷害性あるいは食作用を有する細胞との両方に特異的に結合する融合タンパク質、それを構成する融合ポリペプチド類、その製造法並びにその用途、特に抗腫瘍のための医薬用途に関する。

背景技術

1981年以来癌（悪性腫瘍）は、日本人の死亡原因の1位となっているが、今なお決定的な治療法が存在せず、外科的除去、化学療法、放射線療法、免疫療法が組み合わされて癌の治療に用いられている。免疫療法は未だ開発途上ではあるが多くの可能性を秘めており、これからの進展が期待されている。

癌特異的免疫療法は、癌細胞にのみ細胞傷害性が働く治療法のことを指す。抗体と細胞傷害性を示す薬物とを結合させ、薬物に標的指向性を持たせるもので、現在ではミサイル療法とも呼ばれる。現在、癌細胞において異常に発現している物質または細胞の癌化に伴い多少の変化が起こる物質を標的にして、副作用を最小限にして抗体の能力を発揮できる抗原を使用するといった方向で研究が進められている。このような抗原は癌関連抗原と呼ばれる。

抗体分子は典型的には図1で示されるようなY字型を有する分子で、その基本的な単位は二つの同一の配列を有する重鎖（H鎖）と二つの同一の配列を有する軽鎖（L鎖）の合計して四つのポリペプチドからなり、それらのポリペプチドはジスルフィド結合により結合している。これらの各ポリペプチド鎖は、折り畳まれてそれぞれ別個のドメインを形成している。H鎖及びL鎖のN-末端側領域（N-末端側から約110残基はそのアミノ酸配列がそれぞれの抗体により異なることか

ら、可変領域 (V 領域; V-ドメイン) と呼ばれる。H 鎖のV 領域は、VHと表され、L 鎖のV 領域は、VLと表される。

抗体分子中では、H 鎖とL 鎖のV 領域が互いに近づいて抗原結合部位を形成している。したがって、抗体の抗原特異性は、V 領域により決まるとされている。

一つのVHと一つのVLとを含有する二本の鎖から成り、抗原に対する結合活性を有している最小の単位を Fv (又は Fv ドメイン) と呼んでいる。そして例えば遺伝子工学を利用するなどして、直接あるいはペプチドリンカーなどのリンカーを介して、VHとVLとを結合して得られた一本鎖の Fv を、scFv と呼んでいる。VLは λ 鎖のL 鎖では、アミノ酸残基第1番目から第107番目までの領域、そして κ 鎖のL 鎖では、アミノ酸残基第1番目から第108番目までの領域で、VHはアミノ酸残基第1番目から第113番目までの領域とされている(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Department of health and Human Services, Fourth Edition, U.S. (1987))。

多重特異性抗体のうちの一つである二重特異性抗体(Bispecific Antibody:Bsa b)は2つの異なる抗原に対して特異的に結合することが可能であるため、この特性を生かして特異的な抗腫瘍効果を持った治療薬としての利用法が可能であるとして、その研究が盛んに行われている。ダイアボディ (diabody)とはこのような二重特異性抗体の最小単位であり、それぞれ同じ親抗体由来のVHとVLとが互いに非共有結合によりヘテロ二量体を形成するという性質を利用し考案されたものである。

また、癌の治療において、特に胆管癌は、組織が入り組んだ部位にあるため、癌細胞を完全に除去することが困難で、外科的に切除した後残った癌細胞の除去方法がないという問題があった。こうした問題解決にあたり、例えばダイアボディ形態の二重特異性抗体を含んだ多重特異性抗体が有望視されており、その開発が切望されている。

発明の開示

本発明者等は、少なくとも2つ以上の異なる抗原に対して特異的に結合することが可能であるとのダイアボディ型多重特異性抗体の特性を生かし、少なくとも

2種類以上の細胞間の架橋、具体的には少なくとも一方を腫瘍細胞上の抗原を認識するように、そして他方は細胞傷害性に関与するエフェクター細胞などの表面抗原を認識するように設計することで特異的な抗腫瘍効果を持った治療薬としての利用法が可能となることを見いだした。

本発明者等は、さらに上記腫瘍細胞と細胞傷害性を有する細胞との両方に対して特異的に結合するダイアボディ型多重特異性抗体に、スーパー抗原の機能を付与するとさらに優れた利点があることを見いだして、本発明に至った。

すなわち、本発明は、腫瘍細胞と細胞傷害性を有する細胞との両方に対して特異的に結合するダイアボディ型多重特異性抗体に関する。該ダイアボディ型多重特異性抗体は、遺伝子工学を駆使して、リコンビナント融合タンパク質として得ることができる。

本発明は、(1) 第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と第二の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド(i)、及び(2) 第一の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(c)と第二の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(d)とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチド(ii)を含有し、少なくとも腫瘍細胞と細胞傷害活性を有する細胞の両者に対する結合活性を有することを特徴とする融合タンパク質、それを含有する組成物(例えば、医薬組成物)、その製造方法、それを使用した癌細胞の傷害方法などの用途を提供する。

本発明は、第一の抗体が腫瘍細胞に発現される抗原あるいは癌細胞において異常に発現している物質または細胞の癌化に伴い多少の変化が起こる物質に特異的に結合するものであり、第二の抗体が食作用あるいは細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合するものであり、そして(1) 第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と第二の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド(i)、及び(2) 第一の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(c)と第二の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(d)とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチド(ii)を含有することを特徴とする融合タンパク質、それを含有する組成物(例えば、医薬組成物)、その製造方法、それを使用した癌細胞の傷害方法などの用途を提供する。

本発明は、(1) スーパー抗原(e) と第一の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と第二の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド(iii) 、及び(2) 第一の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と第二の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチド(ii)を含有し、少なくとも腫瘍細胞と細胞傷害活性を有する細胞の両者に対する結合活性を有することを特徴とする融合タンパク質、それを含有する組成物（例えば、医薬組成物）、その製造方法、それを使用した癌細胞の傷害方法などの用途を提供する。

本発明は、第一の抗体が腫瘍細胞に発現される抗原あるいは癌細胞において異常に発現している物質または細胞の癌化に伴い多少の変化が起こる物質に特異的に結合するものであり、第二の抗体が食作用あるいは細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合するものであり、そして(1) スーパー抗原(e) と第一の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と第二の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド(iii) 、及び(2) 第一の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と第二の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチド(ii)を含有することを特徴とする融合タンパク質、それを含有する組成物（例えば、医薬組成物）、その製造方法、それを使用した癌細胞の傷害方法などの用途を提供する。

本発明は、上記融合タンパク質を構成しているポリペプチド、それを含有する組成物（例えば、医薬組成物）、その製造方法、それを使用した癌細胞の傷害方法などの用途を提供する。

本発明は、(1) 腫瘍細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを有することを特徴とする一本鎖ポリペプチド、(2) 腫瘍細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを有することを特徴とする一本鎖ポリペプチド、(3) スーパー抗原(e) と腫瘍細胞に発現

される抗原に特異的に結合する抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを有することを特徴とする一本鎖ポリペプチド、その製造方法、それを使用した癌細胞の傷害方法などの用途を提供する。

。

本発明は、上記の融合タンパク質及び上記の融合ポリペプチドをコードする核酸(DNA、RNA などを含む)、該核酸を含有する複製可能なクローニング又は発現ベクター、該核酸又は該ベクターで形質転換されて得られたものである宿主細胞、それらの製造法並びにそれらの用途を提供する。

本発明は、上記核酸を構築し、該核酸で宿主細胞を形質転換せしめ、該形質転換された宿主細胞中で該核酸を発現せしめ、上記の融合タンパク質及び／又は上記の融合ポリペプチドを回収することを特徴とする方法を提供する。

本発明は、DNA組換え法などを使用して得られたポリペプチドを解離せしめ、次いで該ポリペプチドを再会合せしめ、所望の融合タンパク質を分離して回収することを特徴とする方法を提供する。

本発明は、上記の融合タンパク質及び上記の融合ポリペプチドを薬学的に許容される担体などと共に含有することを特徴とする癌細胞などの腫瘍細胞を排除あるいは傷害するための医薬組成物並びに上記の融合タンパク質及び上記の融合ポリペプチドを投与することを特徴とする腫瘍細胞の除去あるいは殺滅法や癌治療法を提供する。

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

図面の簡単な説明

図1は、典型的な抗体（イムノグロブリン）分子の構造を模式的に示すものである。

図2は、本発明のダイアボディ型多重特異性抗体設計の思想を描くものである。

図3は、MUSE11可変領域とOKT3可変領域とを有するダイアボディ型二重特異性抗体による細胞間架橋の状態を模式的に示すものである。

図4は、MUSE11可変領域とOKT3可変領域とを有するダイアボディ型二重特異性抗体構造にさらに変異SEA を付加したダイアボディ型多重特異性抗体による細胞間架橋の状態を模式的に示すものである。

図5は、本発明のダイアボディ型多重特異性抗体を構成するポリペプチド発現用のベクターの構造を示すものである。A：mSEA-MHOL 発現ベクター、B：OHML 発現ベクター

図6は、構築したベクターを大腸菌で発現し、その発現で得られた菌体内不溶性画分につき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（A）及びWestern-blotting（B）を行なった結果を示す。またIMACによる精製後のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（C）の結果も示す。

図7は、ダイアボディ型多重特異性抗体を用いてのインビトロにおける細胞傷害性活性の測定の結果を示す。

図8は、担癌SCIDマウスにつきダイアボディ型多重特異性抗体を用いてのインビボにおける細胞傷害性活性の測定の結果を示す。横軸は経過時間、縦軸は腫瘍重量を示し、グラフの外側には、上から、対照、LAK 細胞のみ、diabody、mSEA-diabodyの順でグラフで使用する記号の意味が付されている。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、癌特異的免疫療法に関連したダイアボディ型多重特異性抗体、その製造法並びにその用途を提供する。本発明は、腫瘍細胞（特に悪性腫瘍細胞、すなわち癌細胞）と細胞傷害性あるいは食作用を有する細胞との両方に特異的に結合する融合タンパク質、それを構成する融合ポリペプチド類、その製造法並びにその用途、特に抗腫瘍のための医薬用途を提供する。

本明細書中、「タンパク質」あるいは「ポリペプチド」は、互いに交換可能な意味をもつ語として使用している。ここにおいて使用されるように、「ポリペプチド」は、2個以上、一般的には約10個以上のアミノ酸を有するペプチド及びタンパク質を指す。それらは、それらをコードするmRNAの翻訳の後に修飾を受けたものであるとそうでないものにかかわらず本明細書ではすべてを包含する意味で使用するものであり、形質転換細胞により直接培地中に分泌されたものであってもよい。本発明のポリペプチドは1個以上のサブユニットからなるものであってもよいが、好ましくは2個のサブユニットからなるものが挙げられる。そして複数のサブユニットが、同一のDNA配列によりコードされていてもよいし、それぞれが別々のDNA配列によりコードされているものであってもよい。

本明細書中、用語「抗体」は最も広い意味で使用され、そして特に、それらが所望の生物学的活性を示す限りは、単一のモノクローナル抗体、多エピトープ特異性を有する抗体組成物、ならびに抗体フラグメント（例えば、Fvなど）を含んでよい。

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体集団から得られる抗体をいう。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、天然に存在する可能性のある変異体が、少量そこに存在することもある点を除いて、互いに同一である。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位を認識するものである。さらに、代表的には異なる抗原決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むといった従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基を認識するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらがハイブリドーマ培養物によって合成され、他

の免疫グロブリンが混入されていない点で有利な点を持っている。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られるような抗体の特徴を示すことを意味し、そして任意の特定の方法による抗体の産生をそこに必要とするというようには解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ケーラー(Kohler)およびミルシュタイン(Milstein), *Nature* (London) 256: 495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製され得るか、または組換えDNA 法によって作製され得る(例えば、米国特許第4,816,567号(Cabilly et al.)を参照のこと)。本発明で使用されるモノクローナル抗体は、Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) や Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991) に記載の技術を使用して、抗体のファージライブラリーからも単離することができる。

本明細書中のモノクローナル抗体は、特に、それが所望の生物学的活性を示す限りは、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種由来のまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかもしくはは相同であっても、鎖の残りが、別の種由来のまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかもしくはは相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、ならびにそのような抗体のフラグメントを含んでよい(米国特許第4,816,567号; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6851-6855 (1984))。

非ヒト抗体(例えば、マウス抗体)の「ヒト化」形態のものとしては、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合配列)であって、それらは非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むものである。大部分の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(complementarity-determining region; CDR)の残基をマウス、ラット、またはウサギといったような非ヒト動物(ドナー抗体)であり且つ所望の特異性、親和性、および能力を有するCDRに由来する残基によって置換してあるヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体および

導入されたCDR またはフレームワーク配列のいずれにおいても見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに優れたものあるいは最適なものとするために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、および代表的には2つの可変ドメインの実質的な全てを含み、ここで、全てまたは実質的な全てのCDR 領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR 領域に対応する。さらに詳しくは、Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); EP-B-239400; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992); およびEP-B-451216 を参照することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識あるいは結合部位を含む最小の抗体フラグメントである(図2-B)。この領域は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとが非共有結合的に会合しているダイマーからなるものである。各可変ドメインの中の3つのCDR が相互作用して、VH-VLダイマーの配置をとり、該VH-VLダイマーの上にある抗原結合部位を規定している。6つのCDR が、集合して、抗体に対する抗原結合特異性を提供する。しかし、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのCDR のみを含むFvの半分)でさえ、完全な結合部位よりは低い親和性ではあるが、抗原を認識しそしてそれに結合する能力を有する。

「一本鎖Fv (single-chain Fv)」あるいは「scFv」抗体フラグメントとは、ある抗体のVHとVLのドメインを含有しているもので、該ドメインが 一本のポリペプチド鎖中にあるものを指している(図2-C)。一般的には該FvポリペプチドはさらにVHとVLのドメイン間にポリペプチドリンカーを含有し、抗原結合のための所要の構造を与えることを可能にしている。scFvについては、Rosenburg and Moore (Ed.), "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", Vol. 113, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照することができる。

本明細書中「ダイアボディ (diabody)」とは、二つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントであり且つ小さなフラグメントであるものを指し、該フラグメントは、H 鎖の可変領域(VH)に結合するL 鎖の可変領域(VL)をその同じポリペプチド鎖(VH-VL)中に含有しているものである。代表的なダイアボディは、同一の鎖の上にある該二つのドメインの間ではその対合を形成するには短すぎる長さのリンカーを使用することにより、そのドメインを別の鎖の相補性のドメインと対

合せしめ、二つの抗原結合部位を作り出すものである。ダイアボディ及びその製造技術については、米国特許第4,704,692号明細書；米国特許第4,946,778号明細書；米国特許第5,990,275号明細書；米国特許第5,994,511号明細書；米国特許第6,027,725号明細書；EP 404,097；W093/11161；Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照することができ、これらの文献における開示の内容はそれらを参照することにより本明細書の内容に含められる。

本明細書中、「多重特異性抗体(multivalent antibody, multispecific antibody)」は、少なくとも種類の異なる抗原に対して結合特異性を有する分子である。通常はこの様な分子は2個の抗原に結合するのみであろうが（即ち、二重特異性抗体、bispecific antibody: BsAb）、そのうちには三重特異的抗体等の、更なる特異性を持った抗体もこの表現に包含される。また、そのうちには、特異的結合を形成することができるポリペプチドドメインなどの部位、例えばスーパー抗原などをさらに付加的に含んでいることを意味してよい。ダイアボディ型二重特異性抗体のうち、本発明で採用されている特徴ある形態は、異なる2種類の一本鎖抗体scFvのVH, VLをそれぞれ入れ換えることで作製される（図2-D及び2-E）。

。

本明細書中、用語「リンカー(linker)」又は「リンカー領域(linker region)」とは、下記で説明する機能性ポリペプチド・ドメインと機能性ポリペプチド・ドメインとを結合して融合ポリペプチドを与える働きをするオリゴペプチド又はポリペプチドを指している。本明細書では、好ましくは該リンカーはペプチドリリンカーである。該ペプチドリリンカーは、二つのポリペプチドを機能的に結合せしめて一つの融合ポリペプチドを与えることのできるものであれば特に限定されず、例えば当該分野で広く知られたものあるいは該公知のリンカーを改変したものの中から選択して使用することが可能である。該ペプチドリリンカーは、例えば1～約50個のアミノ酸からなるペプチドであってよく、好ましくは約2～30個のアミノ酸からなるペプチド、さらに好ましくは約2～20個のアミノ酸からなるペプチドが挙げられる。用語「機能的に結合」せしめるとは、ポリペプチドを適切に折り畳み(folding)、オリジナルのタンパク質（当該ポリペプチドは該オリジナ

ルのタンパク質に由来するものあるいは該オリジナルのタンパク質から誘導されたものである)の機能、例えば生物活性などの一部あるいはその全てを模擬することができる三次元構造を持った融合タンパク質を与えるような結合を意味する。

また、当該リンカーの長さは、結合せしめられるべきポリペプチドの性状にもよるが、生成する融合ポリペプチド(あるいは融合タンパク質)に所望の活性を与えるものであればよい。該リンカーの長さは、生成せしめられる融合ポリペプチドが適切に折り畳まれて所望の生物活性を得るに十分な長さのものであるべきである。また該リンカーの長さは、所望の生物活性について各種の長さのリンカーで結合した一連の融合ポリペプチドをテストすることにより実験して決定することができる。リンカーについては、上記ダイアボディ及びその製造技術に関連して挙げられた文献などを参照することができる。

融合ポリペプチドにおけるVLとVHの配置は、N-末端側がVLでそれにリンカー、続いてVHと配置されているもの(VL-Linker-VH 構築体)でも、N-末端側がVHでそれにリンカー、続いてVLと配置されているもの(VH-Linker-VL 構築体)のいずれであってもよい。

Fvドメインは、代表的には、モノクローナル抗体から選択される。モノクローナル抗体は、マウスモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体など哺乳動物由来モノクローナル抗体である。

好ましい第一のモノクローナル抗体としては、腫瘍細胞の表面に存在する表面抗原あるいは癌細胞において異常に発現している物質または細胞の癌化に伴い多少の変化が起こる物質に対するものが挙げられる。好ましくは、腫瘍細胞の表面抗原としては、悪性腫瘍細胞(癌細胞)の表面に現れるものが挙げられ、より好ましくはヒト癌表面抗原あるいは癌関連抗原が挙げられる。該腫瘍細胞表面抗原としては、例えば腺癌細胞の表面に現れるものが挙げられ、より好ましくは肝臓癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、腎臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌などで特異的に発現される抗原が挙げられる。該腫瘍細胞表面抗原の例としては、例えばMUC1コアタンパク、CEAなどが挙げられ、好ましくはMUC1コアタンパクが挙げられる。代表的な第一のモノクローナル抗体としては、MUC1特異的抗体、例えばMJUSE1

1 などが挙げられる。

好ましい第二のモノクローナル抗体としては、食作用あるいは細胞傷害性を持つ細胞の表面抗原に対するものが挙げられる。食作用あるいは細胞傷害性を持つ細胞としては、例えばNK細胞、マクロファージ、T-LAK 細胞などのT細胞などが挙げられ、好ましくは細胞傷害性T細胞として知られたT-LAK 細胞が挙げられる。該細胞の表面抗原としては、例えばCD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD16, CD28, CD44などが挙げられ、好ましくはCD3 が挙げられる。代表的な第二のモノクローナル抗体としては、OKT3, T3, Leu4, T11, OKT11, Leu5b, NU-T1, T4, OKT4, Leu3a, NU-TH/I, T8, OKT8, Leu2a, NU-Ts/cなどが挙げられ、好ましくはOKT3, T3, Leu4などが挙げられる。

本発明の融合タンパク質は、腫瘍細胞と細胞傷害活性を有する細胞の両者に対する結合活性を有するものである。該融合タンパク質は、代表的には(1) 第一の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と第二の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド及び(2) 第一の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と第二の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチドを含有するものである。該融合タンパク質において、第一の抗体は腫瘍細胞に発現される抗原に特異的に結合するものであり、第二の抗体は細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合するものである。該融合タンパク質は、(1) 第一の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と第二の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド及び(2) 第一の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と第二の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチドを含有するものとの構成をとることも、ある場合には可能であろう。

別の態様では、本発明の融合タンパク質は、それを構成するポリペプチドのうちの少なくとも一つにスーパー抗原 (SAg)を同一のペプチド鎖上に有するポリペプチドを含有するものである。該スーパー抗原としては、食作用あるいは細胞傷

害性を持つ細胞を特異的に活性化する働きのあるものである。代表的には、T リンパ球細胞を特異的に活性化する働きのあるものが挙げられる。スーパー抗原としては、細菌性エンテロトキシン、例えばブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxin) あるいはその誘導体 (例えば SEA, SEB など)、大腸菌エンテロトキシン、コレラ菌エンテロトキシン、それらの変異体、誘導体などが挙げられる。本発明の融合タンパク質を構成するに好ましいスーパー抗原としては、例えばMHC class IIとの親和力を適度に低下せしめたSEA 変異体 (mSEA) が挙げられる。特に好ましいSEA 変異体としては、SEA-D227A (L. Abrahmsen et al., The EMBO Journal 14(13): 2978-2986 (1995)); U. Holzer et al., Immunology 90: 74-80 (1997)) が挙げられる。

かくして、融合タンパク質は、代表的には(1) スーパー抗原(e) と第一の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と第二の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド及び(2) 第一の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と第二の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチドを含有するものである。また、別の態様では、融合タンパク質は、代表的には(1) 第一の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(a) と第二の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(b) とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド及び(2) スーパー抗原(e) と第一の抗体のL 鎖の可変領域の抗原結合部位(c) と第二の抗体のH 鎖の可変領域の抗原結合部位(d) とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチドを含有するものであってもよい。

本発明の融合タンパク質に含まれる融合ポリペプチドにおいて、スーパー抗原、第一の抗体のH 鎖の可変領域、第二の抗体のL 鎖の可変領域、第一の抗体のL 鎖の可変領域、そして第二の抗体のH 鎖の可変領域は、好ましくは上記リンカーを介して配置される。

本明細書において、用語「細胞(cell)」、「細胞株 (cell line)」、および「細胞培養物(cell culture)」は互いに交換可能に使用され、そして全てのこのような呼称は、その子孫を含む。全ての子孫は、故意または偶然の変異によって、

DNA 含有物について正確には同一でなくても良いことが理解されよう。そこには、元の形質転換細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能または生物学的特性を有する変異体子孫が含まれる。

本明細書において、用語「宿主細胞(host cell)」とは一般的には真核細胞の宿主あるいは原核細胞の宿主である。例えば、適した宿主細胞としては、下記で説明するようなものが挙げられる。

用語「形質転換(transformation)」とは、生物体にDNA を導入し、該DNA を染色体外のエレメントあるいは染色体内に組み込まれたエレメントとして複製可能ならしめることを指している。

用語「トランスフェクション(transfection)」とは、コードされている配列が実際発現していようとまいと、宿主細胞により発現ベクターが取り込まれることを指している。

用語「トランスフェクションされた宿主細胞」とか「形質転換された」とは、細胞中にDNA を導入することを指している。こうした細胞を「宿主細胞(host cell)」と呼び、それは原核細胞であっても真核細胞であってもよい。代表的な原核細胞の宿主細胞としては、大腸菌(*E. coli*) の各種の菌株が挙げられる。代表的な真核細胞の宿主細胞としては、哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、ヒト由来細胞などが挙げられる。導入されるDNA 配列としては、宿主細胞と同種のものから宿主細胞とは異なった種のものであることができ、外来のDNA 及びホモロガスなDNA を含んでいる、ハイブリッドDNA 配列であってよい。

本明細書中用語「複製可能な発現ベクター(replicable expression vector)」および「発現ベクター(expression vector)」は、DNA (通常は二本鎖である) の断片(piece) をいい、該 DNA は、その中に外来のDNA の断片を挿入せしめることができる。外来のDNA は、異種DNA (heterologous DNA) として定義され、このものは、対象宿主細胞においては天然では見出されないDNA である。ベクターは、外来DNA または異種DNA を適切な宿主細胞に運ぶために使用される。一旦、宿主細胞中に入ると、ベクターは、宿主染色体DNA とは独立に複製することが可能であり、そしてベクターおよびその挿入された (外来) DNA のいくつかのコピー

が生成され得る。さらに、ベクターは外来DNA のポリペプチドへの翻訳を可能にするのに不可欠なエレメントを含む。従って、外来DNA によってコードされるポリペプチドの多くの分子が迅速に合成されることができる。

用語「ベクター (vector)」は、適切な宿主中で DNA配列を発現するように、適切な制御配列(control sequence)とそれが機能するように(operably)連結せしめられた DNA配列を含有する DNA構築物(DNA construct)を意味している。そうした制御配列としては、転写(transcription) させるためのプロモーター、そうした転写を制御するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードしている配列、そして転写や翻訳(translation) の終了を制御する配列が挙げられる。

該ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、あるいは単純にゲノムの挿入体(genomic insert)であってよい。一旦、適切な宿主の中に形質転換で導入せしめられると、該ベクターは宿主のゲノムとは独立して複製されたり、それが機能するものであってよい。また該ベクターは、ゲノムの中に組み込まれるものであってよい。

本明細書において「プラスミド(plasmid)」及び「ベクター(vector)」という語は、互いに交換可能な意味の語として使用されている。

プラスミドは、ベクターのうち最も一般的に使用される形態のものであるが、本発明においてはそれと同等な機能を示すものであれば、その他の形態のベクターも包含され、公知のものあるいは当該分野で知られるようになったものも包含せしめられる。

発現「制御配列」(expression "control sequence")とは、ある特定の宿主生物体においてそれが機能可能に結合されているコード配列を発現するのに必要とされる DNA配列を指すものである。原核細胞に適した制御配列としては、プロモーター、場合によりオペレーター配列、そしてリボソーム結合部位が挙げられる。また、真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。

「単離された (isolated)」核酸分子とは、固定がなされており、通常天然の抗体の核酸源に付随するような夾雑物である核酸分子の少なくとも一つから分離

せしめられているような核酸分子を指すものである。

単離された核酸分子とは、自然界に見出される形態あるいはその存在状態とは異なったものをいう。それ故に、単離された核酸分子は、自然界の細胞中に存在するものとは区別できるものであるが、例えば、該核酸分子を天然の細胞におけるとは異なった染色体上の位置にあって、普通に抗体を発現している細胞中に含まれている核酸分子はそれに含まれてよい。

核酸が別の核酸配列と機能的な関係を有しながら配置されている場合、その核酸は「機能可能に結合されている(operably linked)」と言われる。これは、適当な分子(例えば、転写活性化タンパク(translational activator protein)など)を調節配列(regulatory sequence)に結合せしめた場合に、遺伝子の発現を可能ならしめるような形態で遺伝子と調節配列とが結合していることを指している。

例えば、あるポリペプチドを前駆タンパク質として分泌せしめられるように発現する場合、プロペプチド配列あるいは分泌用リーダー配列などのDNAは、そのポリペプチド用DNAに機能可能に結合せしめられる。DNA配列の転写をなすためには、コード配列にプロモーターやエンハンサーが機能可能に結合せしめられ、さらにDNA配列の転写あるいはアミノ酸への翻訳をなすためには、コード配列にリボソーム結合部位が機能可能に結合せしめられる。

一般的にいて、「機能可能に結合」とはその結合しているDNA配列が、隣接して配置されていること(特に分泌用リーダー配列の場合隣接し、リーディングフレームに配置されている)を意味するが、エンハンサーの場合は、隣接して配置されてはいない。結合は、慣用の制限酵素部位のところで連結(ligation)して行われる。もしそのような制限酵素部位がない時は、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーを当該分野で知られた方法で使用して行われる。

「オリゴヌクレオチド」は、短い長さの、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドであり、これは、公知の方法(例えば、EP 266, 032に記載されるような固相技術を使用する、ホスホトリエステル法、ホスファイト法、またはホスホルアミダイト法、またはFroehler et al., Nucl. Acids Res. 14, 5399 (1986))によって記載されるような方法によって化学的に合成される。次いでこれらは

、ポリアクリルアミドゲル上で精製される。

抗体生成のための幾つかの技術は当該分野で知られ、文献にその記述がなされている。そうした抗体生成技術としては、例えばモノクローナル抗体作成のための伝統的ハイブリドーマ法、抗体作成のための組換え技術（例えば、ヒト化抗体等のキメラ抗体を含む）、トランスジェニック動物における抗体産生、及び最近記述された“完全ヒト”抗体調製のためのファージディスプレイ技術などが挙げられる。これらの技術につき、以下に簡単に説明する。

問題の抗原に対するポリクローナル抗体は、一般的には該抗原及びアジュバントを複数回、皮下(sc)または腹腔内(ip)に注射することによって、動物の体内に生成せしめうる。抗原（または標的アミノ酸配列を含む断片）を、免疫を受ける動物種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペット・ヘモシアニン、血清アルブミン、チログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビター等に、二官能性の試薬または誘導体化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介しての結合）、グルタルアルデヒド、スクシンアルデヒド、チオニルクロライド、または $R^1N=C=NR$ （ R 及び R^1 が異なるアルキル基である）等を使用して結合させることは有用であろう。動物は、 $1\text{ }\mu\text{g}$ ～ 1 mg のコンジュゲート（ウサギまたはマウスのそれぞれについて）を3倍容のフロイントの完全アジュバントと合わせて、溶液を複数回皮内注射することにより、抗原、免疫原性コンジュゲートまたは抗原誘導体に対して免疫される。1カ月後に、動物はフロイントの完全アジュバント中のコンジュゲート液を元の量の $1/5$ ～ $1/10$ の量を用いて、複数回皮下注射することにより、追加免疫される。7～14日後に、動物から採血して得た血清につきその抗体力価をアッセイする。力価がプラトーに至るまで動物は追加免疫を受ける。好ましくは動物は同じ抗原であるが、異なるタンパク質に結合されるか、及び／または異なる交差結合剤を介して結合されたコンジュゲートにより追加免疫を受ける。コンジュゲートは、組換え細胞からの培養物中に融合タンパク質としてそれを調製することもできる。アラム(alum)等の凝集剤も、免疫応答を増強するために使用される。

モノクローナル抗体は、Kohler & Milstein, Nature 256: 495(1975)により最初に記述されたハイブリドーマ法を使用して実質的に均質な抗体の母集団から得られるし、あるいは組換えDNA 法（米国特許第4,816,567号明細書）によって作ることができる。ハイブリドーマ法においては、マウスまたは他の適当な宿主動物、例えばハムスター等が、上述のようにして免疫され、免疫に使用したタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するリンパ球細胞、あるいは該抗体を産生することができるリンパ細胞を誘導する。別法として、リンパ球細胞はインビトロにて免疫されてもよい。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を使用してミエローマ細胞と融合され、ハイブリドーマ細胞が形成される（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986）。このようにして調製されたハイブリドーマは、好ましくは細胞融合していない親のミエローマ細胞の成長または生存を妨げる1種以上の物質を含んだ適切な培地に播種され、育成される。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素ハイポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠損する場合には、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的にはHGPRT-欠損細胞の成長を阻害する物質であるハイポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう（HAT培地）。好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高水準の抗体発現を支持するもので、かつHAT 培地等の培地に感受性の細胞である。これらのうちで好ましいミエローマ細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA から入手可能なもので、例えばMOPC-21 及びMPC-11マウスの腫瘍から誘導されるもの、及びAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USAから入手可能なもので、例えばSP-2, X63-Ag8-653 細胞等のマウスのミエローマ系細胞である。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記述がなされている（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984);及びBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）。ヒトモノクローナル抗体産生技術に関しては、さらにBoerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991) 及びW091/17769も参照で

きる。

ハイブリドーマ細胞が生育している培養培地につき、問題の抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてのアッセイを行う。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合の特異性は、免疫沈降により、あるいは放射イムノアッセイ(RIA) または酵素免疫アッセイ(ELISA) 等のインビトロ結合アッセイにより測定される。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson & Pollard, *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980)のスカッチャード分析により測定されることもできる。所望の特異性、親和性及び/または活性をもった抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されたなら、次に該クローンを限界希釈法によりサブクローニングにかけ、標準的な方法で生育せしめられる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-104 (Academic Press, 1986)。このために好適な培養培地としては、Dulbeccoの修飾Eagle 培地、またはRPMI-1640 培地が挙げられる。更に、ハイブリドーマ細胞は、動物の腹水の腫瘍としてインビボにて増殖せしめられることができる。サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、培養培地、腹水、または血清から、例えばタンパク質A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィー等の慣用のイムノグロブリン精製方法により好適に分離される。

別法としては、現在では免疫により、内因性イムノグロブリンの産生なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生しうるトランスジェニック動物(例えばマウス)を作成することが可能である。例えば、キメラ性の生殖系列にある変異マウスにおける抗体重鎖の結合領域(JH)遺伝子を同系接合的に欠損せしめると、内因性抗体の産生が完全に阻害されたことが知られている。ヒト生殖系列イムノグロブリン遺伝子配列の、そのような生殖系列変異マウスへの転移は、抗体の攻撃によってヒト抗体の産生を招くであろう(例えば、Duchosal et al., *Nature* 355:258 (1992); Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258(1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993)参照)。ヒト抗体はファージ・ディスプレイライ

ブラリーから誘導することもできる (Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991); Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130: 41-68 (1992); Vaughan et al., Nature Biotech. 14: 309 (1996))。

本発明において抗体をコードするDNA は、慣用の方法を使用して容易に単離することができるし、さらにその配列決定をすることができる (例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより行うことができる) (R. Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837 (1993))。上記したハイブリドーマ細胞は、そのようなDNA の好ましい供給源として役に立つ。cDNAライブラリーから、文献記載の配列に基づいてハイブリダイゼーションにより、あるいはポリメラーゼチェーンリアクション(PCR) 技術により単離されうる。一旦単離されれば、DNA は発現ベクター中に配置され、次いでこれを、*E. coli* 細胞、COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、またはイムノグロブリンを産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞にトランスフェクションさせ、該組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成させることができる。PCR 反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば R. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988 ; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989 ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990)); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR 法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロ

トコルに従って実施することもできる。ハイブリダイゼーションについてはL. Grossman et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 29 (Nucleic Acids and Protein Synthesis, Part E), Academic Press, New York (1974)などを参考にする事ができる。DNA など核酸の配列決定は、例えばSanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)などを参考にする事ができる。また一般的な組換えDNA 技術は、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (ed.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)及び D. M. Glover et al. (ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)などを参考にできる。

更なる態様において、抗体または抗体断片は、例えばMcCafferty et al., Nature, 348: 552-554(1990)に記載されている技術を使用して抗体ファージライブラリーから、単離することができる(Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)及びMark et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)には、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の単離についてのそれぞれの記載がある)。適当な抗体または抗体断片を選択するためには、問題の抗原を使用して行うことができる。さらには、チェーン・シャッフリング法(chain shuffling)によって高親和性 (nMのオーダーの範囲) のヒト抗体を産生したり (Mark et al., Bio/Technol. 10: 779-783 (1992))、極めて大きいファージライブラリーを構築するための手法として、組合せ感染 (combinatorial infection)及びインビボ組換え (Waterhouse et al., Nuc. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993))なども知られている。これらの技術は、本発明に包含されるモノクローナル抗体の単離の為の伝統的なハイブリドーマ技術によるモノクローナル抗体取得に対する実行可能な別法である。

非ヒト抗体のヒト化方法は、この分野で周知である。一般的には、ヒト化抗体は非ヒト供給源から導入された1個以上のアミノ酸残基を有している。これらの

非ヒトアミノ酸残基は、典型的には可変領域から得られる。ヒト化は、基本的には、例えばJones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechman et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al, Science 239: 1534-1536 (1988))などに記載の方法に従って、齧歯類CDRsまたはCDR 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより行われることができる。従って、そのようなヒト化抗体はキメラ抗体である（米国特許第4,816,567号）。実際には、ヒト化抗体は、典型的には幾つかのCDR 残基が、齧歯類抗体の類似部位に由来する残基によって置換されたヒト抗体である。抗原に対する高い親和性及び他の望ましい生物学的性質を維持して抗体をヒト化することが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親及びヒト化配列の3次元イムノグロブリンモデルを使用し、親配列及び種々の概念的ヒト化生成物を分析する工程により、ヒト化抗体が調製される。3次元イムノグロブリンモデルは、当業者にはよく知られている。選択されたイムノグロブリン配列の候補の、可能性ある3次元配置構造を例示して表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を見ることにより、候補イムノグロブリン配列の、機能におけるその残基の可能性ある役割の分析、即ち候補イムノグロブリンの、その抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能となる。この様にして、残基が共通配列及び導入配列から選択され、結合されることができ、標的抗原に対して増大した親和性等の所望の抗体特性を得ることが可能となる。更に詳細については、W092/22653を参照することができる。

「オリジナルの核酸」は、適宜融合ペプチドをコードするように改変されることができ（即ち、遺伝子工学的に操作されるか、変異誘発される）且つ問題の興味あるポリペプチドをコードする核酸を意味する。オリジナルの核酸とは、天然に生じる核酸であってよく、または予め改変を受けた（例えば、ヒト化抗体断片）核酸を含んでいてもよい。核酸の「改変」とは、オリジナルの核酸に存在する対象アミノ酸残基をコードする少なくとも一つのコドンにおける、挿入、欠失または置換によって変異生成されることを意味する。通常は、オリジナルのアミノ酸残基をコードするコドンを、導入されるアミノ酸残基をコードするコドンによ

り置換することによりなされる。この様な様式で、DNA を遺伝子的に修飾する技術は、Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. Mcpherson (Ed.), (IRL Press, Oxford, UK(1991) における総説において示されており、例えば、位置指定変異導入法（部位特異的変異導入法）、カセット変異誘発法及びポリメラーゼチェーンリアクション(PCR) 変異生成法を含む。

オリゴヌクレオチド-仲介変異誘発法は、ポリペプチドをコードするDNA の置換変異体調製のために好ましい方法である。この技術は、Adelman et al., DNA, 2: 183 (1983)により記述されているようにこの分野で周知である。その方法を簡単に説明すると、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを、抗体の所定の部分の未改変または天然のDNA 配列を含むプラスミドまたはバクテリオファージの単鎖形態のDNA テンプレートにハイブリダイズさせることにより該ポリペプチドは改変される。ハイブリダイゼーションの後に、オリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、抗体あるいは目的融合ポリペプチドDNA において、選択された改変をコードするであろうテンプレートの相補鎖全体を合成するためにDNA ポリメラーゼが使用される。

カセット変異誘発法は、Well et al., Gene 34: 315 (1985)などに記載されている。対象DNA の領域を、相補的オリゴヌクレオチドにアニール化することにより生成された合成変異断片により置換することによって行われ得る。PCR 変異生成法も、ポリペプチドDNA の変異体を作成するために好適である。下記の記載ではDNA を引用して説明するが、この技術はRNA に対しても応用しうることは理解されよう。PCR 技術は、一般的にはErich, Science, 252: 1643-1650 (1991)などに記載がある。

ポリペプチドリンカーは、例えば、組換え技術、インビトロペプチド合成、酵素的または化学的なペプチド結合によるアミノ酸残基の導入法といった技術等、あるいはこれらの技術の任意の組合せによって、合成的手段により、例えばVLとⅧの間の部分に導入されることができる。従って、導入されたリンカーは、“非天然”または“非本来的”であって、このことは、それが天然には、あるいはオリジナルのポリペプチドには存在しないことを意味する。

本願発明に従って、DNA 構築物を構築する（変異することも含む）のに続いて、分子をコードするDNA は、この分野で広く利用可能な組換え技術を使用して発現される。しばしば選択される発現系としては、融合ポリペプチドが適切にグリコシル化されるように（例えば、グリコシル化された抗体領域を含む場合）、哺乳動物細胞の発現ベクター及び宿主が挙げられる。しかしながら、分子を原核性発現系にて産生させることもできる（例えば、リコンビナント Fv はVHとVLを含有している二つの鎖を共発現して微生物から分泌させて得られることが知られており（例えば、A. Skerra et al., Science 240: 1038-1041 (1988); M. Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988)など）、また同一のポリペプチド鎖上にありフレキシブルなリンカーを介して結合しているVHとVLを含有しているポリペプチドが、scFv フラグメントを作りだすことも知られており（例えば、R. E. Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); J. S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)など）、それらに準じて操作することもできる）。通常は、宿主細胞は、単一ベクターまたは独立した複数ベクター上の、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両者をコードするDNA あるいは複数のポリペプチドから構成される多量体を形成するために必要なポリペプチドをコードするその他のDNA により形質転換される。しかしながら、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを独立した発現系にて発現させ、外発現されたポリペプチドをインビトロにて結合させることも可能である。

本発明の融合ポリペプチドをコードする核酸（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）は、更なるクローニング（DNA の増幅）または発現の為に複製可能なベクターに挿入される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの成分は、限定されるものではないが、普通、次の1種以上のエレメントを含む：シグナル配列、複製のオリジン、1種以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終止配列。

融合ポリペプチドは、シグナル配列または成熟タンパク質若しくはポリペプチドのN-末端に特異的な切断部位をもった他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして産生されうる。一般的には、シグナル配列はベクターの部品であるか、あるいはベクターに挿入されるDNA の一部であることができる。選択される異種的

シグナル配列は、好ましくは宿主細胞によって認識され、処理される（即ち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものである。原核性宿主細胞については、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーからなる群から選択される原核性シグナル配列によってそれを置換することができる。酵母分泌については、天然のシグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロマイセス及びクルイベロマイセス(*Kluyveromyces*) α -因子リーダー（米国特許第5,010,182号）、または酸性ホスファターゼリーダー、C. アルビカンスグルコアミラーゼリーダー（EP362,179）、またはW090/13646に記載のシグナル等によって置換されてもよい。哺乳動物細胞発現においては、天然のシグナル配列（例えば、通常インビボにおいてヒト細胞からのこれらの分子の分泌を支配する抗体の先行配列）は、十分に利用可能なものであるが、例えば単純ヘルペスgDシグナル等のウイルス性分泌リーダーに加えて他の哺乳動物シグナル配列も好適である。この様な前駆体領域のDNAは、目的多量体タンパク質を形成するポリペプチドをコードするDNAに対して読み枠内で連結される。

発現及びクローニングベクターの両者は、1種以上の選択される宿主細胞内でベクターが複製することを可能とする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいては、この配列は宿主染色体DNAとは独立して、ベクターが複製することを可能とするもので、複製のオリジンまたは自己複製配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母及びウイルスについて周知である。プラスミドpBR322由来の複製オリジンは、殆どのグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミドオリジンは、酵母に適しており、また種々のウイルスオリジン(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV またはBPV)は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製部品のオリジンは、哺乳動物発現ベクターについては必要はない（SV40オリジンは、それが早期プロモーターを含むために典型的に使用される）。

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含まなければならない。典型的な選択遺伝子は、(a) 例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリン等の抗生物質または他の

トキシンに対する耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠損を補う、または(c) 例えば、バチルス[®]のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のように複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を阻止する薬剤を使用する。異種的遺伝子により成功裏に形質転換されたそれらの細胞は、薬剤耐性を与えるタンパク質を産生し、従って、選択培養において生き延びる。このような優勢選択の例は、ネオマイシン (Southern et al., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982))、マイコフェノール酸 (Mulligan et al., Science 209: 1422 (1980))またはハイグロマイシン (Sugden et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985))等の薬剤を使用する。上記の3種の例は、適切な薬剤、G418またはネオマイシン (ゲネチシン)、xgpt (マイコフェノール酸) またはハイグロマイシンに対する耐性を与えるために、それぞれ真核性の制御下において細菌性遺伝子が使用される。

哺乳動物細胞についての適当な選択マーカーの別の例は、DHFRまたはチミジンキナーゼ等の所定のポリペプチド核酸を選択的に採り上げるのに有能な細胞を同定することを可能とするものである。哺乳動物の形質転換は、マーカーを採り上げることによって形質転換体が生存するために固有に適合する選択圧のもとにおかれる。選択圧は、媒質中の選択剤濃度が順次変化させられ、これによって選択遺伝子及び所定のポリペプチドをコードするDNA の両者の増幅が導かれるような条件下で、形質転換体を培養することによりそれに負荷される。所定のポリペプチドの増幅された量は、増幅されたDNA から合成される。増幅可能な遺伝子の別の例は、メタロチオネイン I 及び II、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等を含む。例えば、DHFR選択遺伝子により形質転換された細胞は、最初に全ての形質転換体をDHFR拮抗剤であるメトトレキセート (MTX) を含む培養培地中で培養することにより同定される。天然型DHFRを採用した場合、適切な宿主細胞は、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980) に記載されているようにして調製され、増殖されたDHFR活性を欠失するCHO 細胞である。次いで、形質転換された細胞は増大する濃度のメトトレキセートに曝される。これは、DHFR遺伝子の複数コピーの合成を導き、付随して融合ポリペプチドの部分をコードするDNA 等

の発現ベクターを含む他のDNAの複数コピーを合成する。この増幅技術は、例えば、MTXに対して高度に耐性である変異DHFR遺伝子が採用された場合に、内因性DHFRの存在に関わらず、例えばATCC No. CCL61 CHO-K1等の任意の適当な宿主に利用できる(EP117,060)。

別法として、融合ポリペプチド、天然型DHFRタンパク質、及び他の選択可能なマーカー、例えばアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)等をコードするDNA配列により形質転換または共形質転換された宿主細胞(特に内因性DHFRを含む天然型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418等のアミノグリコシド抗生物質等の選択マーカー様の選択試薬を含む培地中で細胞培養することにより選択されることができる(米国特許第4,965,199号参照)。

酵母において使用するための適当な選択遺伝子は、酵母プラスミド YRp7 に存在する *trp1* 遺伝子である(Stinchcob et al., *Nature* 282: 39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7: 141 (1979); または Tschemper et al., *Gene* 10: 157 (1980))。 *trp1* 遺伝子は、トリプトファン中での生育能力を欠く酵母の変異株、例えば、ATCC No. 44076 または PEP4-1 等に対する選択マーカーを与える(Jones, *Genetics* 85: 12 (1977))。酵母宿主細胞ゲノム中で *trp1* に損傷があると、トリプトファンが存在しない下では、生育による形質転換の検出のために役立つ環境を与えていることになる。同様に、*Leu2*-欠損酵母株(ATCC 20,622 または 38,626)は、*Leu2* 遺伝子を保有する既知のプラスミドにより補われるのである。

更に、1.6 μ m の環状プラスミド pKD1 から誘導されたベクターは、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 酵母を形質転換するために使用されることができる(Bianchi et al., *Curr. Genet.* 12: 185 (1987))。更に最近では、リコンビナント子牛キモシンを大規模に産生するための発現系が、*K. ラクティス* (*K. lactis*) について報告されている(Van den Berg, *Bio/Technology* 8: 135 (1990))。クルイベロマイセスの工業用株によるリコンビナント成熟ヒト血清アルブミン分泌のための安定なマルチコピー発現ベクターも知られている(Fleer et al., *Bio/Technology* 9: 968-975 (1991))。

発現及びクローニングベクターは、普通、宿主生物に認識され且つ目的ポリペ

プチド核酸に機能可能に連結されているプロモーターを含んでいる。種々の可能性ある宿主細胞に認識される多くのプロモーターが周知である。これらのプロモーターは、制限酵素消化により供給源DNA からプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクター中に挿入することにより、融合ポリペプチドコードDNA に機能的に連結される。

原核性宿主と共に使用するために適したプロモーターは、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 (Chang et al., Nature 275:615 (1978);及びGoedel et al., Nature 281:544 (1979))、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp) プロモーター系 (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980) 及びEP 36,776) 並びに tacプロモーター等のハイブリッドプロモーター (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25(1983)) を含む。しかしながら、他の既知の細菌性プロモーターも適している。それらのヌクレオチド配列は文献に記載されており、これによって熟練した研究者が、いずれかの必要とされる制限部位を供給する為のリンカーまたはアダプターを使用して、それらを融合ポリペプチドをコードするDNA (Siebenlist et al., Cell 20:269 (1980)) に機能的に結合することを可能としている。細菌系において使用されるプロモーターは、融合ポリペプチドをコードするDNA に機能的に連結されたシャイン-ダルガルノ (S. D.) 配列も含むであろう。

真核細胞系についても、プロモーター配列というものが知られている。実質的には、全ての真核性遺伝子は、転写開始部位から約25~30塩基上流に位置するATに富んだ領域を有している。多くの遺伝子の転写開始から70~80塩基上流に見い出されるその他の配列は、CXCAAT領域 (Xは任意のヌクレオチドであることができる) である。殆どの真核性遺伝子の3'末端は、AATAAA配列で、それはコード配列の3'末端にポリAテイルを付加するシグナルであることができる。これらの配列の全ては、真核性発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主により使用するための適当なプロモーター配列の例は、3-ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073 (1980)) または他の解糖酵素 (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968)); 及びHolland, Biochemistry 17:4900 (1978))、例えば、エノラーゼ、グリセ

ルアルデヒド-3- ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6- ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートミューターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼ等のプロモーターが挙げられる。

その他の酵母プロモーターであって、生育条件によりその転写が制御されるという付加的な利点を有する誘導可能なプロモーターとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に伴う分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3- ホスフェートデヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素のプロモーター領域などがある。酵母での発現において使用するために好適なベクター及びプロモーターは、Hitzeman et al., EP73, 657 A に記載されている。酵母エンハンサーも、酵母プロモーターと共に有利に使用される。

哺乳動物宿主細胞中でのベクターからの融合ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス (UK2, 211, 504)、アデノウイルス (アデノウイルス2等)、ウシパピローマウイルス、トリサルコーマウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)等のウイルスゲノム由来、例えばアクチンプロモーターまたはイムノグロブリンプロモーター等の異種哺乳動物プロモーター由来、または熱ショックプロモーター由来にて得られるプロモーターによって制御される。

SV40ウイルスの初期または後期プロモーターは、SV40ウイルス性複写オリジンも含むSV40の制限酵素断片として都合良く得られる (Fiers et al., Nature 273:113(1978); Mulligan and Berg, Science 209:1422-1427(1980); Pavlakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7398-7402(1981))。ヒトサイトメガロウイルスの即時型プロモーターは、HindIII E 制限断片として都合良く得られる (Greenaway et al., Gene 18:355-360(1982))。ベクターとしてウシパピローマウイルスを使用する哺乳動物宿主におけるDNA 発現系は、米国特許第4, 419, 446 号明細書に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4, 601, 978 号明細書に記載されている。サル細胞における免疫インターフェロンをコードするcDNAの発現

について、Gray et al., Nature 295:503-508(1982);単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下におけるマウス細胞中でのヒト β -インターフェロンcDNAの発現について、Reyes et al., Nature 297:598-601(1982);培養されたマウス及びウサギ細胞中でのヒトインターフェロン β 1遺伝子の発現について、Canaani and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5166-5170(1982);ラウスサルコーマウイルスの長い末端反復をプロモーターとして使用するCV-1サル腎細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞及びマウスNIH-3T3細胞における細菌性CAT配列の発現について、Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781(1982) もここで参照される。

より高度な真核性細胞による融合ポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによりしばしば増加せしめることができる。エンハンサーは、相対的には配向及び位置に依存せず、転写単位の5'側(Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:993(1981))及び3'(Lusky et al., Mol. Cell Bio. 3:1108(1983))、イントロン内(Banerji et al., Cell 33:729(1983))並びにコード配列それ自体の内部(Osborne et al., Mol. Cell Bio. 4:1293(1984))のうちに見い出されている。今日では多くのエンハンサー配列が哺乳動物遺伝子から知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェト蛋白及びインシュリン)。しかしながら、典型的には真核性細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用されるであろう。例えば、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複写オリジンの後期側にあるSV40エンハンサー(bp100-270)、複写オリジンの後期側に位置するポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核性プロモーターの活性化の増強するエレメントについては、Yaniv, Nature 297:17-18(1982) もここで参照される。エンハンサーは、融合ポリペプチドコード配列の5'または3'位置においてベクター中にスプライスされ得るが、好ましくはプロモーターの5'部位に配置される。

真核性宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞)は、転写終了及びmRNAの安定化に必要な配列を含むであろう。この

様な配列は、真核性またはウイルス性DNA またはcDNAの5' 及び場合により3' 非翻訳領域から一般に入手可能である。これらの領域は、融合ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分においてポリアデニル化された断片として転写されるヌクレオチド部分を含む。

上記にあげた1種以上の部品を含む適当なベクターの構築は、標準的連結技術を使用する。単離されたプラスミドまたはDNA断片は、必要とされるプラスミドを生成させるために要求される形態に切断され、対合され、再度連結される。

構築されたプラスミドにおいて正しい配列か否かを確認するための分析には、連結した混合物でもって、*E. coli* K12 の294株(ATCC 31,446)を形質転換し、次に成功した形質転換体が適切なものである場合にはアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性によりそれを選択する。形質転換体からプラスミドが調製され、制限エンドヌクレアーゼにより分析され、及び/またはMessing et al., *Nucleic Acids Res.* 9:309(1981)の方法、若しくはMaxam et al., *Methods in Enzymology* 65:499(1980)の方法により配列決定される。

この発明の実施において特に有用なものは、融合ポリペプチドをコードするDNAを哺乳動物細胞において一過的に発現するような発現ベクターである。一般に、一過的発現は、宿主細胞において効率的な複製を可能とする発現ベクターの使用を含み、かくして宿主細胞が発現ベクターの多数のコピーを蓄積し、次いで該発現ベクターによりコードされる所望のポリペプチドを高水準でもって合成する(J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., pp. 16.17-16.22, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。好適な発現ベクター及び宿主細胞を有する一時的発現系は、都合良く、クローン化されたDNAによりコードされるポリペプチドが陽性か否かの同定を可能とし、所望の結合特異性/結合アフィニティを有する融合ポリペプチドの迅速なスクリーニングを可能とする。

組換え脊椎動物細胞における融合ポリペプチドの合成に適用するために好適な他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gething 等、*Nature* 293:620-625(1981); Mantei等、*Nature* 281:40-46(1979); Levinson等、EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。融合ポリペプチドを哺乳動物細胞培養物として発現するた

めに特に有用なプラスミドは、pRK5(EP 307, 247)またはpSVI6B(W091/08291)である。

融合ポリペプチド発現のための宿主細胞の選択は、主に発現ベクターに依存する。他の考慮すべき点は、必要とされる蛋白量である。一過性トランスフェクションにより、しばしばミリigramの量を産生させることは可能である。例えば、アデノウイルスEIA-形質転換293 ヒト胚腎細胞系は、pRK5-ベースのベクターを用いてリン酸カルシウム法の修飾による一過性トランスフェクトされることができ、効率的な融合ポリペプチドの発現を可能にする。CDM8-ベースのベクターは、DEAE-デキストラン法によってCOS 細胞をトランスフェクトするために使用されることができる (Aruffo et al., Cell 61:1303-1313(1990); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. (US) 9:347-353(1990))。大量のタンパク質が望まれる場合に、所望の融合ポリペプチドは、宿主細胞系の安定的なトランスフェクションの後に発現されることができる。例えば、pRK5-ベースのベクターは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)をコードし、G418に対する耐性を付与する付加的プラスミドの存在下で、CHO 細胞に導入されることができる。G418耐性のクローンは、培養の際に選択されることが可能である。これらのクローンは、増大する濃度のDHFR阻害剤メトトレキセートの存在下で培養されると、DHFR及び融合ポリペプチド配列をコードする遺伝子コピーの数が、共に、増幅されるようなクローンがそこで選択される。融合ポリペプチドがN-末端に疎水性のリーダー配列を含む場合には、それはトランスフェクトされた細胞により切断され、分泌されるであろう。より複雑な構造をもった融合ポリペプチドの発現では、固有に適合させた宿主細胞がそれに必要となろう。例えば、軽鎖または重鎖等の部品は、ある種のミエローマまたはハイブリドーマ宿主細胞により与えられるであろう (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940(1987) 及び Martin et al., J. Viro. 67:3561-3568(1993))。ここにおいてベクターをクローン化し、発現する為のその他の適当な宿主細胞は、上述した原核細胞、酵母、または他のより高度な真核細胞である。この目的に適当な原核細胞としては、グラム陰性またはグラム陽性生物等の真正細菌、例えば、腸内細菌科の、例えば、E. coli 等の大腸菌(E. coli)、プロテウス(Proteus)、エンテロバクター(Enterobacter)、クレブシエ

ラ(*Klebsiella*)、エルウィナ(*Erwinia*)、サルモネラ・チフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)等のサルモネラ、セラチア・マルセスカンス(*Serratia marcescans*)等のセラチア、シゲラ(*Shigella*)、バチルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)及びバチルス・リヒェニホルミス(*Bacillus licheniformis*)等のバチルス、シュードモナス・アエルギノーザ(*Pseudomonas aeruginosa*)等のシュードモナス、並びにストレプトマイセス(*Streptomyces*)が挙げられる。一つの好ましいE. coli クローニングあるいは発現宿主は、E. coli M101株、E. coli 294 株(ATCC 31,446)であるが、E. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31,537)、E. coli W3110 (ATCC 27,325)、E. coli XL-1 (Stratagene)、E. coli HB101、E. coli NM522、E. coli NM538、E. coli NM539、E. coli DH5 α 、E. coli DH10B、E. coli JM109 及び等のその他の株も好適である。これらの例は例示的であって、限定的なものではない。E. coli W3110 株は、組換えDNA 生成物発酵のための一般的な宿主株であって、特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは宿主細胞は、最小限の原核性酵素を分泌するものであるべきである。例えば、W3110 株は、E. coli W3110 27C7株(ATCC 55,244)の例があるようにタンパク質をコードする遺伝子において遺伝的変異を生じるように修飾されることができる。27C7株の完全な遺伝子形は、tonA Δ tpr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 ompT Δ deg P41karf である。別法として、米国特許第4,946,783 号明細書に開示された変異ペリプラズムプロテアーゼを有するE. coli 株を用いることができる。別法として、例えば、PCR または他の核酸ポリメラーゼ反応のクローニング方法も好適である。

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核性微生物も、融合ポリペプチドコードベクターの為のクローニング及び発現宿主である。サッカロマイセス・セレビシア(*Saccharomyces cerevisiae*)または通常のパン酵母は、下等真核性宿主微生物の内では最も普通に使用されている。しかしながら、シゾサッカロマイセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, Nature 290:140(1981); EP 139,383); クルイベロマイセス属(*Kluyveromyces*) 宿主 (米国特許第4,943,529 号明細書; Fleer et al., Bio/Technology 9:968-975(1991))、例えば *K. lactis* (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J.

Bacteriol. 737(1983))、*K. ドロソフィラルム*(*K. drosophilae*)(ATCC 36,906 ; Van den Berg, Bio/Technology 8:135(1990))、*K. フラギリス*(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、*K. ワルチ*(*K. walti*)(ATCC 56,500)、*K. ブルガリカス*(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、*K. ウィケラミ*(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、*K. サーマートレランス*(*K. thermotolerans*)、及び*K. マルキシアヌス*(*K. marxianus*)等；ヤロウィア(*Yarrowia*)(EP 402,226)；*ピキア・パストリス*(*Pichia pastoris*)(EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28:265-278(1988))；*カンジダ*；*トリコダルマ・リーシア*(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；*ニューロスボラ・クラッサ*(*Neurospora crassa*)(Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263(1979))；*シュワンニオマイセス*属(*Schwanniomyces*)、例えば*シュワンニオマイセス・オクシデンタリス*(EP 394,538)；並びに糸状菌類、例えば、*ペニシリウム*(*Penicillium*)、*ニューロスボラ*(*Neurospora*)、*トリポクラジウム*(*Tolypocladium*)(WO 91/000357)、及び*アスペルギルス*属宿主、例えば、*A. ニデュランス*(*A. nidulans*)(Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289(1983); Tilburn et al., Gene 26:205-221(1983); Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474(1984))及び*A. ニジェール*(*A. niger*)(Kelly and Hynes, EMBO J. 4:475-479(1985))等の多くの他の属、種、及び株が、普通に入手可能であり、また有用である。

グリコシル化融合ポリペプチドの発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。そのような宿主細胞は、複雑な処理及びグリコシル化が可能である。原則的には、脊椎動物であるか無脊椎動物であるかに関わらず任意のより高度な真核性細胞培養物が、使用可能である。無脊椎生物細胞の例としては、植物及び昆虫が挙げられる。多くのバキュロウイルス株及び変異体並びに対応する許容される昆虫宿主細胞、例えば、*スポドプテラ・フルギペルダ*(*Spodoptera frugiperda*)(イモムシ)、*アエデス・アルボピクタス*(*Aedes albopictus*)(蚊)、*アエデス・アエギプチ*(*Aedes aegypti*)(蚊)、*ドロソフィラ・メラノガステル*(*Drosophila melanogaster*)(ミバエ)、及び*ボンビックス・モリ*(*Bombyx mori*)が同定されている。例えば、Luckow et al., Bio/Technology 6:47-55(1988); Miller et al., Genetic Engineering, Selow et al. (Ed.), Vol.8 (Plenum Publi

shing, 1986), pp. 277-279; 及び Maeda et al., Nature 315:592-594(1985)がここで参照されよう。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えばアウトグラファ・カリフォルニカ(*Autographa californicas*) NPV のL-1 変異体及びボンビックス・モリNPV のBm-5株が、公的に入手可能であり、このようなウイルスは、本発明に従って、特にハポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのために使用されることができる。宿主として、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト及びタバコ等の植物細胞培養物を使用することができる。典型的には、植物細胞は、予め融合ポリペプチドDNA を含むように操作された細菌、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) のある種の株と共に培養することによってトランスフェクトされる。*A. tumefaciens*と一緒に植物細胞培養物を培養するとその間に、融合ポリペプチドをコードするDNA は植物細胞宿主に転移されてトランスフェクトされ、適切な条件下では融合ポリペプチドDNA を発現するであろう。更に、植物細胞に適合する制御及びシグナル配列、例えば、ノパリンシンセーゼプロモーター、及びポリアデニル化シグナル配列等が入手可能である(Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:561(1982))。加えて、T-DNA 780 の上流領域から単離されたDNA 断片は、組換えDNA 含有植物組織において、植物で発現可能な遺伝子の転写水準を活性化または増大することが可能である(EP 321, 196)。

好ましい宿主は、脊椎動物細胞であり、培養(組織培養)によって脊椎動物細胞を増殖することは近年では常法になっている(Kruse and Patterson (Ed.), Tissue Culture, Academic Press, (1973))。有用な哺乳動物宿主細胞系の例としては、サル腎臓細胞(CV1, ATCC CCL70);SV40 (COS-7, ATCC CRL1651)により形質転換されたサル腎臓CV1;アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト胚腎臓系(293細胞または懸濁培養における生育についてサブクローン化された293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59(1977)); 胎児ハムスター腎臓細胞(BHK, ATCC CCL10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980)); マウスセルトリー細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));マウス乳癌(MMT 060562, ATCC CCL51); イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL34); バッファローラット肝臓細胞

(BRL3A, ATCC CRL1442); ヒト頸部悪性腫瘍細胞(HeLa, ATCC CCL2); ヒト肺細胞(W 138, ATCC CCL75); ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065); TRI 細胞 (Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383: 44-68(1982)); MRC5細胞; FS4細胞; ヒトヘパトーマ系細胞(Hep G2)などが挙げられる。

宿主細胞は、本発明の上記発現ベクターまたはクローニングベクターによりトランスフェクトされ、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修正した慣用の栄養培地中で培養という処理がされる。トランスフェクションは、使用される宿主細胞に応じて、そのような細胞に適切な標準的技術を使用して行われる。J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) の1.82節に記述されるように塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションが、原核細胞または実質的に細胞壁といった障壁を有するその他の細胞について一般に使用される。アグロバクテリウム・ツメファシエンズによる感染は、Shaw et al., *Gene* 23:315(1983)及びWO 89/05859 に記述されるように、ある種の植物細胞の形質転換に使用される。更に、植物は、WO 91/00358 に記述される様に、超音波処理を使用してトランスフェクトされてもよい。

細胞壁を持たない哺乳動物細胞については、Graham and van der Eb, *Virology* 52:456-457(1978)のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳動物細胞宿主系の形質転換についての一般的技術は、米国特許第4,399,216号において記載されている。酵母への形質転換は、典型的には、Van Solingen et al., *J. Bact.* 139:946(1977) 及びHsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3829(1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNA を細胞に導入する他の方法、例えば、核のマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、完全細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリブレン、ポリオルニチン等の多価陽イオンも使用されることができる。哺乳動物細胞の形質転換のための種々の技術については、Keown et al., *Methods in Enzymology* (1989)、Keown et al., *Methods in Enzymology* 185:527-537(1990)、及びMansour et al., *Nature* 336:348-352(1988)をここで参照できる。

本発明の融合ポリペプチドポリペプチドの産生に使用される原核性細胞は、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) に一般的に記載されているように、適当な培地において培養される。

本発明の融合ポリペプチドポリペプチドの産生に使用される哺乳動物宿主細胞は、種々の培地中で培養されうる。商業的に入手可能な培地、例えば、HamF10(Sigma)、最小必須培地(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、ダルベッコの修飾イーグル培地(DMEM, Sigma) は、宿主細胞の培養に好適である。Ham and Wallace, Methods in Enzymology, 58:44(1979); Barnes and Sato, Anal. Biochem. 102:255(1980); 米国特許第4,767,704号; 米国特許第4,657,866号; 米国特許第4,927,762号; 米国特許第4,560,655号; WO 90/03430; WO 87/00195; 米国再審査特許第30,985号または米国特許第5,122,469号に記載されているいずれの培地も宿主細胞の培養培地として使用されることができる(上記文献の開示はそれを参照することにより本明細書の内容に含められる)。これらの培地はいずれも必要に応じて、ホルモン類及び/又は他の成長因子(インシュリン、トランスフェリン、または上皮成長因子等)、塩類(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩等)、緩衝剤(HEPES, Tris等)、ヌクレオシド(アデノシン及びチミジン等)、抗生物質(ゲンタマイシンTM剤等)、微量元素(通常、マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される)及びグルコースまたは同等なエネルギー源等が補われていてよい。必要な他のいずれの補充剤も、当業者に既知の適切な濃度で含まれてもよい。温度、pH等の培養条件は、発現のために選択された宿主細胞について、以前に使用されたことのある条件であり、また当業者には明らかであろう。

哺乳動物細胞培養物の生産性を最大にするための原則、プロトコール、及び実際的な技術は、一般的にはMammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler (Ed.), IRL Press, 1991の内に見い出すことができる。該文献の開示において引用される宿主細胞のうちには、培養物中の細胞、宿主動物内に存在する細胞なども含まれる。

本明細書に記載のDNA, RNA などの核酸、ポリペプチド、タンパク質などは、い

ずれも必要に応じて、当該分野で広く知られた方法を適用して化学合成することも可能である。

発現させるなどして得られた融合ポリペプチドはそれを回収することができる。好ましくは融合ポリペプチドは、一般に分泌されたポリペプチドとして培養培地から回収されるが、それが分泌シグナルを持たずに直接に産生された場合には宿主細胞溶解物から回収されてもよい。融合ポリペプチドが膜結合性である場合には、適当な洗浄剤（例えば、トリス-X100）を使用して膜から遊離せしめることができる。

融合ポリペプチドがヒト由来細胞以外の組換え細胞において産生された場合には、ヒト由来のタンパク質またはポリペプチドを全く含有しない。しかしながら、融合ポリペプチドについて実質的に均質な調製物を得るために、該融合ポリペプチドを組換え細胞タンパク質またはポリペプチドから精製する必要がある。最初の工程として、培養培地または溶解物は、粒状の細胞破片を除くために、通常遠心分離される。抗体融合ポリペプチドは、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィーによって好適に精製される。ここでアフィニティクロマトグラフィーは、好ましい精製技術の一つである。タンパク質精製のためのその他の技術、例えば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースでのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン樹脂クロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラム等）、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿等も、回収されるポリペプチドによってはそれを利用することができる。アフィニティリガンドが結合される担体は、多くの場合アガロースであるが、他の担体も利用可能である。調整多孔質ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定した担体は、アガロースで達成されるよりも速い流速及び短い処理時間を可能とする。一般に適切なリガンドが選択された場合には、培養液から所望の融合ポリペプチドを直接的且つ効率的に結合せしめることができる。

本発明においては、会合してタンパク質を構成している二つ以上のポリペプチ

ドをそれぞれのポリペプチドに分離したり、あるいは会合しているドメイン同志を互いに離れた状態にすることができる。これを「解離」処理という。解離処理は、好ましくは解離剤 (dissociating agent) を使用して行うことができる。解離剤としては、当該分野で広く知られたものが挙げられ、例えばエタノールなどのアルコール類、グアニジン塩酸塩、尿素などが挙げられる。その他の解離処理に使用できるものとしては、界面活性剤あるいはタンパク質のコンフォメーションの維持を妨害する機能を持った類似の試薬などが挙げられ、当業者はそれらにつき良く知っているものである。具体的な態様では、グアニジン塩酸塩とエタノールとの組み合わせを解離剤として使用できる。好適には、0～50容量%のエタノール、0～2.0 mol/L (M) のグアニジン塩酸塩を使用できる。より好適には、10～30容量%のエタノール、0.5～1.0 mol/L のグアニジン塩酸塩であり、さらには20容量%のエタノール、0.5 M のグアニジン塩酸塩が挙げられる。好適な解離処理用バッファとしては、0.5 M グアニジン塩酸塩、20容量%のエタノール、0.05 M Tris 及び 0.01 M CaCl_2 を含有し、pH 8.0の水溶液が挙げられる。

会合処理は、解離せしめられたポリペプチドあるいはドメインを適切な配置に戻すことを意味してよい。会合処理は、ポリペプチド同志あるいはドメイン同志を会合した状態に戻すという意味も有しているので「再会合」ともいうことができるし、所望の生物活性を有するものにするという意味で、再構成ということもできし、リフォールディング (refolding) ともいわれてよい。会合処理は、適切なバッファ溶液中でポリペプチド同志あるいはドメイン同志を所要の配置にして互いを会合せしめることにより実施できる。該バッファとしては、例えば 0.04 M MOPS、0.10 M 酢酸カルシウムからなっている、pH 7.5の水溶液が挙げられる。その他、VHとVLとを再会合するに適していると、当該分野の当業者に知られているものであれば制限なく使用できる。

本発明の「単離された」融合ポリペプチド又は融合タンパク質は、同定され、及びその天然の細胞培養環境の成分から分離及び／または回収された融合ポリペプチド又は融合タンパク質を意味する。その天然環境の夾雑成分は、本発明の融合ポリペプチド又は融合タンパク質の診断的または治療的使用を妨害する可能性のある物質であって、酵素、ホルモン類、及び多くのタンパク質性または非タン

パク質性の溶質を含んでいるかもしれない。好ましい実施態様において、該融合ポリペプチド又は融合タンパク質は、(1) ローリー法により測定される場合にタンパク質重量で95%より多いという程度まで、あるいは最も好ましくは重量で99%より多いという程度まで、(2) spinning cup sequentatorを使用することにより、N-末端または内部アミノ酸配列につき、少なくとも15残基を得るに充分であるという程度まで、または(3) クーマシーブルー若しくは、好ましくは銀染色を使用しての、還元または非還元条件下でのSDS-PAGEにより均質であるという程度まで精製されるであろう。

本発明の融合ポリペプチドは、一般的には実質的に均質であるまで精製される。「実質的に均質」、「実質的に均質な形態」及び「実質的均質性」等の句は、生成物が望ましからぬポリペプチドの組合せに由来する副生成物を実質的に欠いていることを示すために使用される。純度によって表される場合に、実質的均質性とは、副生成物の量が重量百分率で10%を越えず、好ましくは5%未満であり、更に好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満であることを意味する。

本発明の活性物質は、(1) 第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と第二の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド及び(2) 第一の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(c)と第二の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(d)とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチドを含有し、腫瘍細胞と細胞傷害活性を有する細胞の両者に対する結合活性を有することを特徴とする融合タンパク質、あるいはその融合タンパク質を構成している融合ポリペプチド、さらには該融合ポリペプチドの少なくとも一つのペプチド鎖にスーパー抗原ポリペプチドが結合されている融合ポリペプチド及び該スーパー抗原ポリペプチド付加融合ポリペプチドを含有する融合タンパク質、それらの塩を包含する。本発明の活性物質は、本発明の目的、その趣旨、そして本明細書に開示した技術を適用して得られ且つ優れた性状を有するものすべてを包含してよい。

本発明の活性物質には、多くの治療的応用が考えられる。例えば、本発明の活性物質は、腫瘍細胞の殺傷したり、排除するのに使用でき、抗腫瘍剤として有用

である。本発明の活性物質は、腫瘍細胞と細胞傷害活性を有する細胞の両者に対する結合活性を有するダイアボディ、さらには該ダイアボディの機能を増強した改変型ダイアボディといってよいものを包含し、腫瘍細胞、特に悪性腫瘍細胞（あるいは癌細胞）に特異結合し、インビボ又はインビトロで腫瘍細胞の機能的な活性を実質上阻害又は排除することのできるものを指す。

本発明の様々な態様において、精製された本発明の融合ポリペプチドは、癌患者に投与して、腫瘍細胞、特に悪性腫瘍細胞（あるいは癌細胞）の生存又は生長を抑制あるいは阻止することができる。

本発明の活性物質は、好ましくは局所適用により、腫瘍部位にデリバリーされるが、ここで「局所的」とは、腫瘍細胞に対して局所的という意味であり、必ずしも表皮などの皮膚への適用を指すものではない。局所的に適用される時、本発明の活性物質は、通常、担体及び／又はアジュバントのような他の成分と混合せしめられることができる。かかる他の成分としては、薬学上許容し得るものでなければならず、また意図された投与に対しても効能がなければならず、そして本発明の活性物質の効能を低下せしめたり又は不活性化しないものでなければならぬという事以外、その性質の上での制約は無い。

本発明の活性物質は、所望の純度を有する融合タンパク質などを、生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤などを選択して、それらと混合することによって、貯蔵に適した凍結乾燥粉末または水溶液の形態に調製することができる (A. Osol (Ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 Edition, (980)). こうした治療用剤型において許容される担体、賦形剤または安定化剤としては、採用される投与量及び濃度において受容者に対して非毒性であるものであり、例えばリン酸塩、クエン酸塩及びその他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたはイムノグロブリン等の蛋白質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又はトウイーン、プル

ロニクスまたはポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

本発明の活性物質は、例えばコアセルベート技術によって、または界面ポリマー化によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ- [メチルメタクリレート] マイクロカプセル）中、コロイド状薬剤分配系（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、またはマクロエマルジョン等に入れたものであってよい。この技術はA. Osol (Ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 Edition, (1980) に開示されている。

インビボ投与のために使用される本発明の活性物質は、無菌状態のものでなければならない。無菌化処理は、凍結乾燥及び再構成に先行するかまたは引き続いて、無菌フィルター膜を通しての濾過によって容易に行われる。本発明の活性物質は、普通には凍結乾燥形態または溶液において保存されるであろう。

治療用の本発明の活性物質組成物は、無菌取り出し口を有する容器、例えば、静脈内投与用溶液バッグ、または皮下用注射針をさし込むことのできる栓を有するバイアル等に入れられる。濾過された溶液を凍結乾燥して、粉末型の無菌の本発明の活性物質を生成させることもできる。本発明の活性物質を生体内に投与する方法としては、静脈内、腹腔内、脳内、脊髄内、筋肉内、眼内、動脈内、特に胆管内、又は病変内経路による注入又は注射、及び持続放出型システム製剤による方法が挙げられる。本発明の活性物質は、輸液により連続的に、または大量注射により投与されることができる。

持続放出製剤は、一般的には、そこから本発明の活性物質をある程度の時間放出することのできる形態のものであり、持続放出調製物の好適な例は、蛋白質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性担体を含み、該担体は、例えばフィルムまたはマイクロカプセル等の成型物の形態のものである。持続放出担体の例としては、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1980) 及び Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982) に記述されるポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)のコポリマー)、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58,481

）、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman et al., Biopolymers 22:547-556(1983)）、非分解性エチレンービニルアセテート（Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)）、Lupron Depot™等の分解性乳酸ーグリコール酸コポリマー（分解性乳酸ーグリコール酸コポリマー及びロイプロライドアセテートからなる注射可能な微小球）、並びにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(EP 133,988)が挙げられる。

エチレンービニルアセテート及び乳酸ーグリコール酸等のポリマーは、100 日以上にわたって分子の放出を可能とするが、ある種のハイドロゲルは、蛋白質をより短期間で放出する。カプセル化された蛋白質が長期間体内に残った場合には、それらは37℃において水分に曝され、その結果として変性または凝集を起こし、そして生物学的活性の喪失あるいは免疫原性のあるものへの変化を生じる可能性があるが、それらに関与する機構に応じて、蛋白質安定化のための合理的な戦略が考案されうる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド交換を介しての分子間S-S 結合形成であることが分かった場合には、安定化は、スルヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の調製、適切な添加剤の使用、特異的なポリマー担体組成物の開発等により達成されうる。

腫瘍細胞との接触のための持続放出型の本発明の活性物質の組成物は、リポソームに入れたものが挙げられる。本発明の活性物質を含有するリポソームはそれ自体公知の方法によって製造することができる。例えば、DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034(1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 特開昭58-118008 号; 米国特許第4,485,045 号及び米国特許第4,544,545 号; 並びにEP 102,324の記載を参考にすることができる。通常、リポソームは、微小な（約200-800 オングストローム）単層型のものであって、その脂質含量は、約30%コレステロール以上であるが、至適な療法のために比率が選択され調整されうる。

本発明の活性物質は、担体及び／又はアジュバント、例えばアルブミン、非イオン性界面活性剤及びその他の乳化剤のようなその他の成分と共に調合される。このようなその他の成分の性質としては、それらが薬学上許容し得るものであり、意図される投与に対して効果が無ければならず、そして該組成物中の活性成分

の活性を損なうことがないということを除けば、そこには制約は無い。

所望により本発明の活性物質は、他の既知の抗腫瘍剤と共に投与することもできる。さらに本発明の活性物質は、所望によりIFN、例えばIFN- γ 、及びその他のサイトカインと併せて使用することができるし、又はIFN- γ のようなインターフェロンを含まなくとも良い。かかるサイトカインなどが種特異的である場合は、処置される種にとって適当なサイトカイン又は薬物が選択されるであろう。

本発明に従えば、動物又は人間が処置される。或る動物種を別の種の活性物質で処置することは可能であるが好ましくない場合もある。本発明に係る使用によって好ましい活性物質は可溶性のものである。

本発明の一つの態様において、治療用調合物は、リポソーム内に封入された又はリポソームと複合体形成せしめられた本発明の活性物質を含むものである。例えば、グリコホスファチジルイノシトール部分と共有結合させた本発明の活性物質を用いて、本発明の活性物質を含むリポソームを形成させることができる。さらなる態様において、治療用調合物は、本発明の活性物質を活発に産生する細胞を含むものである。このような細胞は患者の組織中に直接導入することができ、又は多孔性膜内にカプセル化し、次いでこれを患者に移植することができるが、いずれの場合も、本発明の活性物質の濃度を増加せしめたり又は減少せしめることが必要である患者の場合、その患者の体内の所定の領域に本発明の活性物質のデリバリーがなされる。別法として、本発明の活性物質をコードするDNAを含む発現ベクターを患者の細胞のインビボ形質転換のために使用して、同じ結果を達成することもできる。

治療に用いられる本発明の活性物質の有効量は、例えば治療目的、投与経路、及び患者の状態によって決められるであろう。したがって治療者は、用量を調べて、最適な治療効果を得るに必要な投与経路などを変えたりすることが必要となるであろう。典型的な日用量は、上記の因子に応じ、可能ならば、例えば当分野で既知の腫瘍細胞の生存又は生長についての検定法を使用して、まずインビトロで、そして次に、人間の患者のための用量範囲を外挿し得る適切な動物モデルで、適当な用量範囲を決定することもできる。

腫瘍の処置において本明細書に記載される組成物は、例えば皮下又は筋肉内投

与することができ、本発明の活性物質の薬理活性は、本発明に係る組成物の持続放出効果により、長時間にわたって維持することができる。故に投与回数を減らすことができる。この組成物は、直接注射することにより、腫瘍を制御している動脈中への組成物とすることもできる。腫瘍を有する成人患者の処置の場合、本発明の活性物質の用量は、腫瘍の種類、部位、大きさ、及び本発明の活性物質の種類に応じて適宜選択することができる。投与頻度は疾病の種類及び投与型に応じて適宜に選択できる。腫瘍制御動脈中又は腫瘍自身への注射の場合、頻繁な反復注射は必要なく、所望の治療効果のためには1ないし4週間に1回の単一注射で充分となる場合もあり得る。

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、当該分野で知られた方法、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十三改正 日本薬局方解説書、平成8年7月10日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

なお、明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

実施例

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。

なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNA クローニングでは J. Sambrook, E. F. Fritsch & T.

Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 及び D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; 特にPCR 法では、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989 ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及び M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990)に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書(protocols) や添付の薬品等を使用している。

実施例 1

融合タンパク質遺伝子の構築

(1) 抗MUC1一本鎖抗体(MUSE11 scFv、以下"MHL")をコードする遺伝子は pTZ UT-3プラスミドベクター (東北大学大学院工学研究科生物工学教室にてすでに構築してある) を元に作製した。pTZUT-3 はプラスミドベクターであるpUC118のHindIII-EcoRI 部位に、全遺伝子を化学合成した抗ニワトリ卵白リゾチーム抗体(HyHEL10) のscFvを挿入したもので、C 末端側にはc-myc ペプチドタグ並びにHis-tag (Hisx6: ヒスチジン6 量体tag)が並列に導入されている。またscFvのポリペプチドリンカー部位には(GGGGS)₃ (以下"G3") を使用している。

抗MUC1抗体MUSE11は札幌医科大学の今井浩三教授によりクローニングされた抗体でMUSE11産生B 細胞ハイブリドーマを分譲して頂き、ダイナス社 Oligo-dT30 を用いてmRNAを抽出、cDNAを逆転写酵素により調製した。このcDNAからA-B プライマーを用いてPCR 法によりMUSE11 VH(以下"MH") を増幅し、Nco I-Eag I 消化によりプラスミドpTZUT-3 のHyHEL-10 VH をコードする遺伝子断片と入れ換え、続いてC-D プライマーを用いてPCR 法によりMUSE11 VL(以下ML) を増幅し、EcoR V-Sac II 消化によりpTZUT-3 のHyHEL10 VLをコードする遺伝子断片と入れ換えることでpTZUT-3-MHL-G3を作製した。遺伝子配列はダイデオキシ法を用いて決定した。

A Nco I-MH back primer 5'-CCATGGCCGAAGTTAACTGGAATCTGGT-3'
[配列番号：1]

B MH-Eag I forward primer 5'-CGGCCGAGGAGACGGTGAAGTTC-3'
[配列番号：2]

C EcoR V-ML back primer 5'-GATATCGTTATGACCCAGGCCGCGCC-3'
[配列番号：3]

D ML-Sac II forward primer 5'-CCGCGGCTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3'
[配列番号：4]

(2) 抗CD3 一本鎖抗体(OKT3 scFv、以下“OHL”)もpTZUT-3-MHL-G3と同様な方法で作製した。OKT3B 細胞ハイブリドーマは東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより分譲して頂き、上記手法と同様にcDNAを合成した。上記手法と同様にそれぞれ制限酵素部位を含むプライマーE-F でOKT3 VH(以下OH) を、G-H でOKT3 VL(以下“OL”) をPCR 法により増幅し、それぞれ制限酵素消化により、同様の方法で入れ換えることでpTZUT-3-OHL-G3を作製した。またOHはドメイン内のジスルフィド結合に関与しないfreeなCys が存在し、このCys を構造上類似性の高いSer に置換することで安定性を増加させることがある。このためこれに習い変異導入用のI プライマーを設計しKunkel法による部位特異的変異導入により、pSNE4-OHL-G3-HC100aSを作製した。

E Nco I -OH back primer 5'-CCATGGCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCT-3'
[配列番号：5]

F OH-Eag I forward primer 5'-CGGCCGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'
[配列番号：6]

G EcoR V-OL back primer 5'-GATATCGTTCTCACCCAGTCTCCAGCA-3'
[配列番号：7]

H OL-Sac II forward primer 5'-CCGCGGCGTTTATTTTGAACCTTGTCCC-3'
[配列番号：8]

I OH HC100aS mutation primer 5'-GATCATTACTCCCTTGACTAC-3'
[配列番号：9]

(3) Mx3 diabody はMHOL(MH-G3linker-OL)とOHML(OH-G3linker-ML)の二つの分子から作製される。発現ベクターはpTZUT-3-MHL-G3とpTZUT-3-OHL-G3-HC100aSを用いそれぞれNco I-Eag I で消化し、相互にVBを入れ換えることでpSNE4-MHOL-G3、pSNE4-OHML-G3-HC100aS ベクターを作製した。

(4) SEA (Staphylococcus Enterotoxin A)は東北大学附属医療技術短期大学の黒川忠教授より頂いたSEA 産生ブドウ球菌Staphylococcus aureus strain 129株からクローニングを行った。界面活性剤により溶菌後、ゲノムDNA を常法により抽出した。このDNA からJ-K プライマーを用いてSEA 遺伝子をPCR 法により増幅し、Nco I-Xho I 消化によりNovagen 社のpET20bベクターに挿入、pET-SEA を作製した。なお、K プライマーにはSEA のC 末端への融合蛋白質作製の上で必要なリンカー配列(GGGGS)₁ (以下“G1”)を含んでいる。さらにSEA の毒性を低下させるための変異、すなわち227 位のAsp のAla への置換は、L プライマーにより部位特異的変異導入により行い、同様にD227A mutant SEA(以下mSEA) 発現ベクターpET-mSEAを作製した。

J Nco I-SEA back primer 5'-ATTCCATGGCTAGCGAGAAAAGCGAAGAAA-3'

[配列番号: 10]

K SEA-G1-Xho I forward primer

5'-ATCTCGAGTGAACCTCCACCTCCACTTGTATATAAATA-3'

[配列番号: 11]

L SEA D227A mutation primer 5'-CATGCATATTGCTATATATTTA-3'

[配列番号: 12]

mSEA-MHOL をコードする遺伝子の作製は以下のように行った。まずMHOL-G3 を下記M と上記D プライマーを用いてPCR を行い、続いてXho I-Sac II消化によりプラスミドベクターpET-mSEAにおけるXho I-Sac II部位に挿入することで、pET-mSEA-MHOL-G3を作製した。

M Xho I-MH back primer 5'-ATCTCGAGGCCGATATCCAGCTGCAGGAGT-3'

[配列番号: 13]

(5) 融合蛋白質(mSEA-Mx3)をコードする遺伝子は以下の既に構築してある遺伝子を元に作製した。それらは以下の通りである。抗MUC1一本鎖抗体 scFv(MUSE 11scFv: "MHL")をコードした遺伝子を含む発現ベクター(pSNE4-MHL)、抗CD3 一本鎖抗体scFv(OKT3 scFv: "OHL") をコードした遺伝子を含む発現ベクター(pSNE4-OHL)、EcoR V-SacII消化によりそれぞれのVHを入れ換えたMHOL(MUSE11 のVHと linker-OKT3 のVLをポリペプチド (GGGS)、("G3") で結合させたもの)とOHML(OKT3 のVHとMUSE11のVLをG3で結合させたもの) をコードした遺伝子を含む発現ベクターpSNE4-MHOL及びpSNE4-OHML。Staphylococcus aureus由来であるスーパー抗原エンテロトキシンA("SEA")をコードする遺伝子、並びにそのAsp227位をAlaに置換した変異体をコードする遺伝子。

上記OKT3のH 鎖可変領域(VH)には通常存在する二つのCys 以外にもう一つCys が存在し、分子の安定性を低下させることが知られており、OKT3の VH100a 位のCys をSer に変異させたHC100aS 変異体を作製し、融合蛋白質構築に用いた。また、両可変領域を結合させるポリペプチドリンカーについては、(GGGS)₁ ("G1") であるものも同様に構築に用いた。

mSEA-MHOL-G3をコードする遺伝子については、pET20b (Novagen社製) のNco I-Sac II部位にMHOL-G3-WTを導入した後、MHOLの上流にNco I-Xho I でmSEAを導入した。

実施例 2

発現用ベクターの構築

実施例 1 で構築した二つの遺伝子 mSEAMHOL-G3-WT 並びにOHML-G3-HC100aS を大腸菌を宿主とした発現系により発現させるため、必要なプロモーター、シグナル配列、活性検出とタンパク質発現検出のためのペプチド配列、並びにターミネーター配列をコードする遺伝子を付与した。すなわち、T7プロモーター、分泌発現させるためのpel-B シグナルペプチド、タンパク質検出のためのc-myc とタンパク質の精製及び検出のためのヒスチジン6 量体Tag (His Tag) 配列、並びに強力な転写終結因子 SSITerm. を含むベクターpSNE4 の Hind III-Spe I 部位に上記クローニングベクターよりの二つの遺伝子 mSEAMHOL-G3-WT 並びにOHML-G3-HC

100aS を含むHind III-Spe I断片を挿入することで大腸菌発現ベクターpSNE4-mSEAMHOL-G3-WTとpSNE4-OHML-G3-HC100aS を構築した。構築図は図5に示すとおりであった。

実施例 3

大腸菌を用いたmSEAMHOL-G3-WT 並びにOHML-G3-HC100aS の発現

発現ベクターpSNE4-mSEAMHOL-G3-WTとpSNE4-OHML-G3-HC100aS でそれぞれ大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、培養は2xYT培地を用い28℃で行った。O.D.₆₀₀ = 約0.8 となったところで、終濃度1mM のIPTGにより発現を誘導し、一晩振盪培養した。菌体を遠心分離後(この操作により分けられた上清を培地上清とする)、浸透圧処理し(この操作後の上清をペリプラズム画分とする)、さらに菌体を超音波破碎し、遠心後の沈殿を菌体内不溶性画分とした。各画分のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、及びWestern-blottingを行うことによりどの画分に所与のタンパク質が存在しているのかを確認した。図6に結果を示す。

抗His Tag 抗体を用いて行ったWestern blottingによる分析はMHOLはほとんど培地上清に分泌していないこと、MHOL、OHML共に菌体内不溶性画分に最も多く存在することを明らかにし、この画分からのタンパクの調製を行った。

実施例 4

mSEAMHOL-G3-WT並びにOHML-G3-HC100aS の精製

超音波破碎、遠心後の菌体内不溶性画分を6M塩酸グアニジン/PBSに一晩4℃で浸し、タンパク質を可溶化した後、変性状態でHis Tag と特異的に結合する金属キレート樹脂(TALONTM:CLONTECH 社製)を用いた金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。各画分のSDS-PAGEの結果は図に示す。wash画分に多少目的タンパク質の溶出が確認されたが、elute 画分に純度の高いMHOL、及びOHMLが得られた。このような操作は発現を誘導した形質転換体培養液1リットル当たり2mgの目的蛋白質を与えた。

実施例 5

mSEA-Mx3分子の巻き戻し

精製されたタンパク質は塩酸グアニジンにより変性状態となっているので活性を持つ三次構造とするタンパク質を得るためには巻き戻し操作が必要となる。巻き戻しは透析膜に精製タンパク質溶液を入れた。MHOL、OHMLの280 nmにおける吸光度を0.2 (タンパク質濃度約7.5 μ M)に希釈し、2-メルカプトエタノールを終濃度375 μ M 加えて4℃で4時間おくことによる還元反応の後、MHOLとOHMLが1:1で会合することで作製されることを考えそれぞれの精製タンパク質を等量混合した。外液の塩酸グアニジン濃度を1日おきに3 M、2 M、1 M、0.5 M、0 M と徐々に下げていく段階透析法によって、変性剤の除去を行い、途中の1 M と0.5 M の透析段階において、酸化剤として酸化型グルタチオンを終濃度375 μ M、凝集抑制剤としてL-アルギニンを終濃度0.4 M 透析外液に加え4℃に保温することによる酸化反応の促進を図った。このような操作は培養液 1 L (MHOL:500 mL、OHML:500 mL)あたり約1mg(濃度約15 μ g/mL) の収量を与えた。

実施例 6

In Vitroにおける細胞傷害性活性の測定-MTS Assay

MTS assay により、胆管癌細胞TFK-1 がLAK 細胞によりどれほど傷害されたかを測定した。セルカウントを行い、RPMI100 μ L あたり細胞 10^4 個になるよう調整。96穴プレートに100 μ L ずつ分注、37℃で一晩静置。目的蛋白質を目的濃度になるようにRPMIで希釈、前日準備したプレートに蛋白質を50 μ L ずつ分注。LAK 細胞を目的E/T 比になるようにRPMIで希釈し、50 μ L ずつ分注 (E/T 比: effector(LAK)/target(TFK-1))。37℃で48時間培養。プレートの培養液を取り除き、PBS により洗浄、MTS、PMS、RPMIを加え、37℃で30～60分インキュベート。プレートリーダーで490nm の吸光度を測定。

(注) MTS 試薬 (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega社製)、PMS(CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega 社製)

図7に示すように、mSEA を含まない、Diabody でもDose依存的に顕著な細胞傷

害性を観察したが、mSEA-Mx3 については、 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ において、100 % の傷害性を示した。

実施例 7

InVivoにおける細胞傷害性活性の測定

SCIDマウスを納入後、10数日後に 5×10^6 個のTFK-1 細胞をマウスに皮下注射。TFK-1 移植後10日後(腫瘍径約4 mmから6 mm)に 2×10^7 個のT-LAK 細胞と20 μg の mSEA-diabody を混合した後、マウス尾静脈より4 日連続で注入。一週間ごとに腫瘍径を測定し、長径と短径から腫瘍体積を概算した。実験はコントロールの腫瘍径が20 mm を越えたときに終了した。結果は図8に示したとおりである。Diabody においても、ある程度の腫瘍細胞増殖の抑制が観察されたが、mSEA-Mx3 については、8週間にわたり、腫瘍細胞の増殖の完全な抑制を観察した。

考察

Staphylococcal Enterotoxin A (SEA)はブドウ球菌の産生する分子量27.1kDaの蛋白質であり、もっとも強力な免疫賦活剤として知られる。しかし、多量の投与によりサイトカイン依存性トキシックショック症候群を引き起こすことが知られている。これは主にSEA のMHC classII に対する強力な親和力によるもので、脾臓などのMHC classII 陽性組織にSEA が集積し、全身のT 細胞を活性化することに起因する。一方、SEA のD227A 変異体がTCR との親和力を低下させることなくMHC classII との親和力を適度に低下させることが報告され(L. Abrahmsen et al., The EMBO Journal 14(13): 2978-2986 (1995))、さらにウサギを用いた実験でそのD227A 変異体の組織集積性を調べると、正常組織への低集積性を示したことも報告されている(U. Holzer et al., Immunology 90: 74-80 (1997))。

SEA と抗体を結合させてSEA に腫瘍特異性を与えることと、SEA のMHC classII 陽性組織への集積を減少させることは同義ではない。SEA が腫瘍組織とMHC classII 陽性組織の両方に集積したのでは、やはり副作用を抑えられない。副作用を防ぎ、SEA に真の腫瘍特異性を獲得させるためには、抗体との結合だけでなく

、SEA のMHC classII への親和力を低下させる必要がある。SEA D227A 変異体は、SEA の臨床応用において大きな壁となっていた副作用を低減させる可能性がある。

本発明では、癌関連抗原として、MUC1を選択した。MUC1は腺細胞上に多く見られ、繰り返しドメイン中のSer、Thr 残基にO-グリコシド結合で糖鎖が付加した糖タンパクであるが、細胞の癌化に伴い過剰発現し、さらに糖鎖形成不全が起こり、コアタンパクが露出するという特徴を有する。このため、MUC1コアタンパクは高度に腺癌特異的であると考えられており、腺癌関連抗原と呼ばれ、有力な標的分子の一つである。また、本発明では、T 細胞表面にのみ発現し、末梢血中の成熟T 細胞を検出する最良のマーカーとして用いられるCD3 を細胞傷害性T 細胞と結合させる抗原として選択した。こうしてMUC1特異的抗体MUSE11、CD3 特異的抗体OKT3の抗体Fv領域を用いて、diabody を構築した。さらに、このdiabody にSEA-D227A 変異体を融合させた蛋白質を構築した。大腸菌を用いた発現系により調製が可能なように発現ベクターを構築し、その発現をSDS-PAGEとWestern Blottingにより確認した。

細胞特異性はフローサイトメトリーにより確認し、試験管内での、構築融合蛋白質（diabody にSEA -D227A 変異体を融合）の架橋による、胆管癌細胞TFK-1 の殺傷はMTSAssayならびにproliferation assay により確認した。diabody 単独の場合に比べて、きわめて高い癌細胞の殺傷が観察された。また、生体内での癌細胞殺傷能力を調べるため、マウスにヒト腫瘍細胞を移植し、同時に今回構築した融合蛋白質（diabody にSEA -D227A 変異体を融合）、diabody による、腫瘍細胞成長の抑制を観察したところ、diabody においても、約50%の抑制が観察された。さらに、融合蛋白質においては、完全な腫瘍の消滅が観察された。

本発明の好ましい態様では、diabody の持つ細胞架橋能に加え、SEA の持つ腫瘍集積性を維持し、かつSEA による高い副作用を最小限に抑えることを可能にした。完全な腫瘍消滅に導かれた組換え型蛋白質はこれまでに例がない。ダイアボディ型では、①分子量（約 60000）が小さく腫瘍組織内に入り込みやすい、そして②ヒトに対する低免疫原性である、さらに③大腸菌を用いた大量発現により二重特異性抗体の安定供給が可能等の長所がある。2種類の細胞間の架橋、具体的

には一方を腫瘍細胞上の抗原を認識するように設計し、他方は細胞傷害性に関与するエフェクター細胞などの表面抗原を認識するように設計することで特異的な抗腫瘍効果を持った治療薬としての利用法が可能である。

産業上の利用可能性

大量合成が可能であり、さらに組織へのデリバリーにおいても優れ、腫瘍細胞に対して特異的に働いてその副作用の少ない医薬品の開発が可能となる。

特には、癌の治療において、外科的治療で不十分な場合、例えば胆管癌など組織が入り組んだ部位にある癌細胞を完全に除去する方法を提供できると期待される。本発明のダイアボディ型多重特異性抗体は、悪性腫瘍細胞と細胞傷害性細胞とを有意に近接せしめる働きに優れ、優れた抗腫瘍効果を持った治療薬となる。

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

請 求 の 範 囲

1. (1) 第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と第二の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド(i)、及び

(2) 第一の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(c)と第二の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(d)とを同一のペプチド鎖上に有する第二のポリペプチド(ii)

を含有し、

少なくとも腫瘍細胞と細胞傷害活性を有する細胞の両者に対する結合活性を有することを特徴とする融合タンパク質。

2. 第一の抗体が腫瘍細胞に発現される抗原あるいは癌細胞において異常に発現している物質または細胞の癌化に伴い多少の変化が起こる物質に特異的に結合するものであり、第二の抗体が食作用あるいは細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合するものであることを特徴とする請求項1記載の融合タンパク質。

3. 第一の抗体が、MUC1コアタンパク、CEAなどの癌表面抗原あるいは癌関連抗原に特異的に結合するものであり、第二の抗体がCD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD16, CD28及びCD44から成る群から選ばれたものに特異的に結合するものであることを特徴とする請求項1又は2記載の融合タンパク質。

4. 第一の抗体が肝臓癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、腎臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌及び結腸癌から成る群から選ばれたものに特異的に結合するものであり、第二の抗体がNK細胞、マクロファージ、T-LAK細胞などのT細胞から成る群から選ばれたものに特異的に結合するものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか一記載の融合タンパク質。

5. 第一の抗体が、MUC1特異的抗体、例えばMJUSE11などから成る群から選ばれたものであり、第二の抗体が、OKT3, T3, Leu4, T11, OKT11, Leu5b, NU-T1, T4, OKT4, Leu3a, NU-TH/I, T8, OKT8, Leu2a 及び NU-Ts/cから成る群から

選ばれたものであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一記載の融合タンパク質。

6. 第一の抗体が、MJUSE11であり、第二の抗体が、OKT3であることを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載の融合タンパク質。

7. 第一のポリペプチドが、スーパー抗原(e)と第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と第二の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを同一のペプチド鎖上に有する第一のポリペプチド(iii)であることを特徴とする請求項1～6のいずれか一記載の融合タンパク質。

8. スーパー抗原が、細菌性エンテロトキシン、その変異体、あるいは誘導体であることを特徴とする請求項1～7のいずれか一記載の融合タンパク質。

9. スーパー抗原が、ブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal enterotoxin) あるいはその誘導体 (例えば SEA, SEB など)、大腸菌エンテロトキシン、コレラ菌エンテロトキシン、それらの変異体、誘導体から成る群から選ばれたものであることを特徴とする請求項1～8のいずれか一記載の融合タンパク質。

10. スーパー抗原が、SEA-D227Aであることを特徴とする請求項1～9のいずれか一記載の融合タンパク質。

11. 第一のポリペプチドが、第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と第二の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを連結するペプチドリンカーを含有していることを特徴とする請求項1～10のいずれか一記載の融合タンパク質。

12. 第二のポリペプチドが、第一の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(c)と第二の抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(d)とを連結するペプチドリンカーを含有していることを特徴とする請求項1～11のいずれか一記載の融合タンパク質。

13. 第一のポリペプチドが、スーパー抗原(e)と第一の抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)とを連結するペプチドリンカーを含有していることを特徴とする請求項1～12のいずれか一記載の融合タンパク質。

14. 請求項1～13のいずれか一記載の融合タンパク質を含有する組成物。

15. 腫瘍細胞を傷害するためのものである請求項14記載の組成物。

16. 腫瘍細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを有することを特徴とする一本鎖ポリペプチド。

17. 腫瘍細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(c)と細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(d)とを有することを特徴とする一本鎖ポリペプチド。

18. スーパー抗原(e)と腫瘍細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のH鎖の可変領域の抗原結合部位(a)と細胞傷害活性を有する細胞に発現される抗原に特異的に結合する抗体のL鎖の可変領域の抗原結合部位(b)とを有することを特徴とする一本鎖ポリペプチド。

19. ペプチド鎖中に存在する各ドメインを連結するペプチドリンカーを含有していることを特徴とする請求項16～18のいずれか一記載の一本鎖ポリペプチド。

20. 請求項16宿主記載の一本鎖ポリペプチドをコードするDNA、
請求項17記載の一本鎖ポリペプチドをコードするDNA、
請求項18記載の一本鎖ポリペプチドをコードするDNA、及び
請求項19記載の一本鎖ポリペプチドをコードするDNA
から成る群から選ばれたものを含有することを特徴とする核酸。

21. 請求項20記載の核酸を含有することを特徴とする複製可能なクローニング又は発現ベクター。

22. ベクターが、プラスミドであることを特徴とする請求項21記載のベクター。

23. 請求項20記載の核酸又は請求項21又は22記載のベクターで形質転換されて得られたものであることを特徴とする宿主細胞。

24. 宿主細胞が、真核細胞又は原核細胞であることを特徴とする請求項23記載の宿主細胞。

25. 請求項20記載の核酸を構築し、該核酸で宿主細胞を形質転換せしめ、該形質転換された宿主細胞中で該核酸を発現せしめ、請求項16～19のいずれか一記載の一本鎖ポリペプチドを回収することを特徴とする請求項16～19のいずれか一記載の一本鎖ポリペプチドの製造方法。

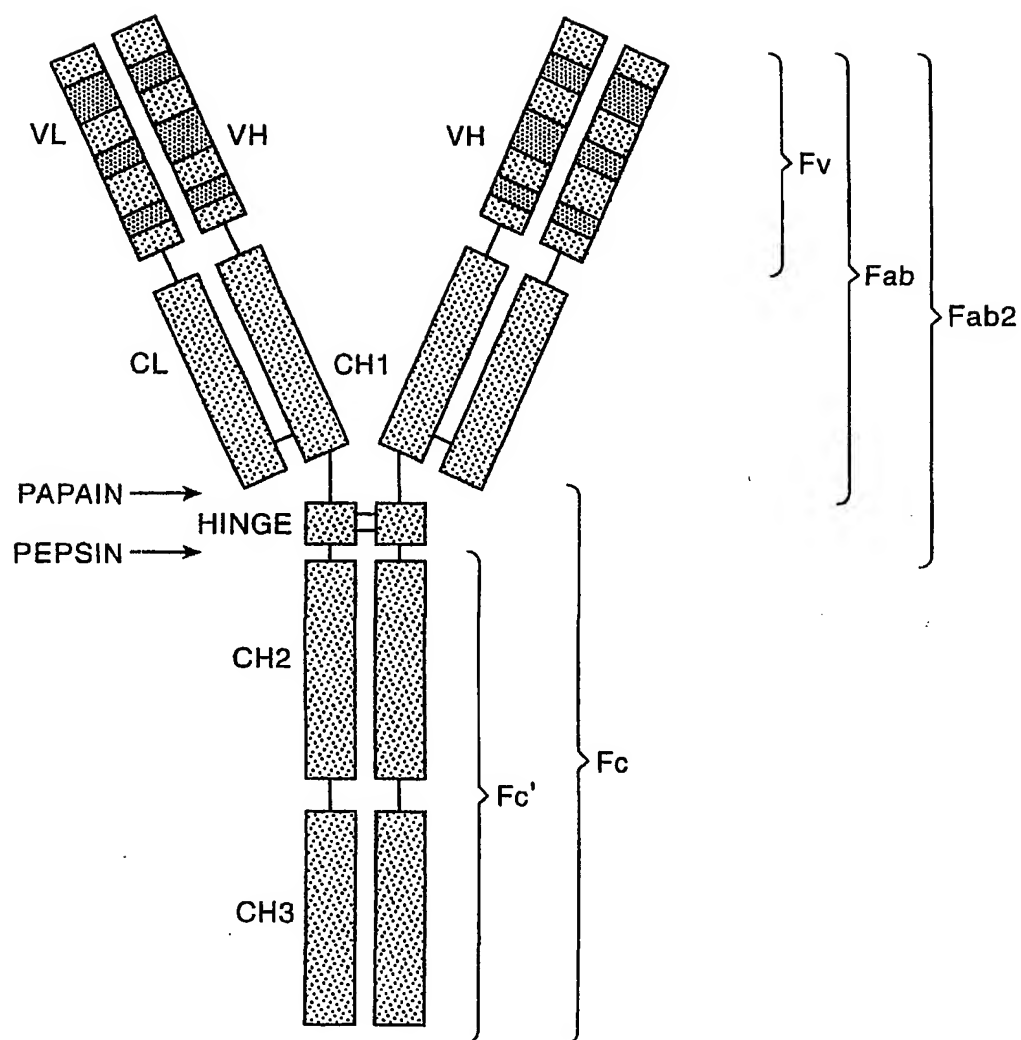
26. 請求項26記載の方法で得られた一本鎖ポリペプチドを解離せしめ、該一本鎖ポリペプチドを再会合せしめ、会合した請求項1～13のいずれか一記載の融合タンパク質を分離して回収することを特徴とする請求項1～13のいずれか一記載の融合タンパク質の製造方法。

27. 請求項1～13のいずれか一記載の融合タンパク質；請求項16～19のいずれか一記載の一本鎖ポリペプチド；請求項20記載の核酸；請求項21又は22記載のベクター；及び請求項23又は24記載の宿主細胞から成る群から選ばれたものを有効成分とすることを特徴とする医薬。

28. 腫瘍細胞を排除する、殺傷する、傷害する及び／又は減少せしめるためのものであることを特徴とする請求項27記載の医薬。

29. mSEA-Mx3を有効成分とすることを特徴とする請求項27又は28記載の医薬。

図 1



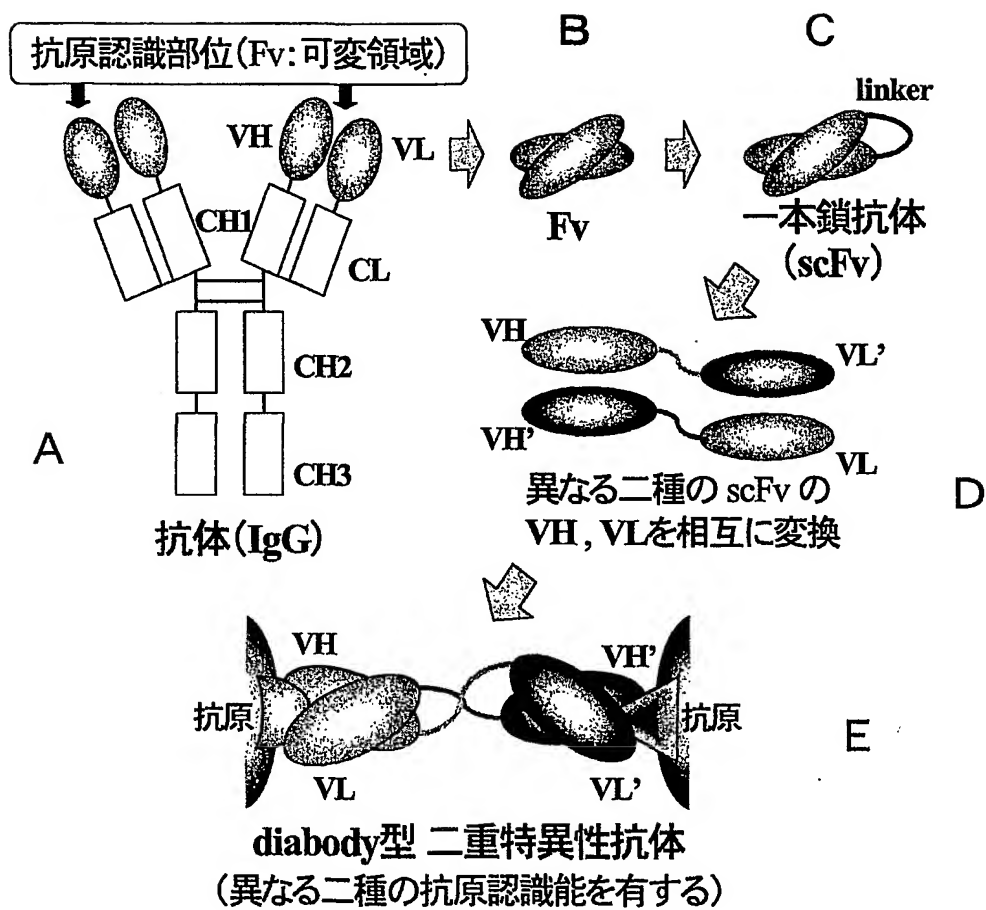
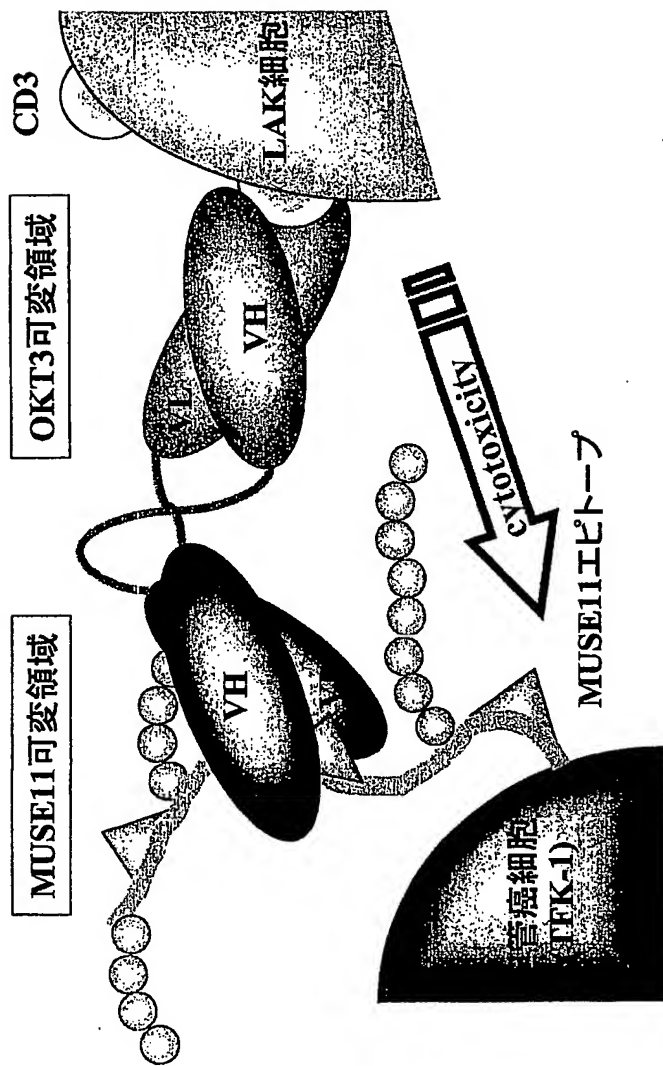
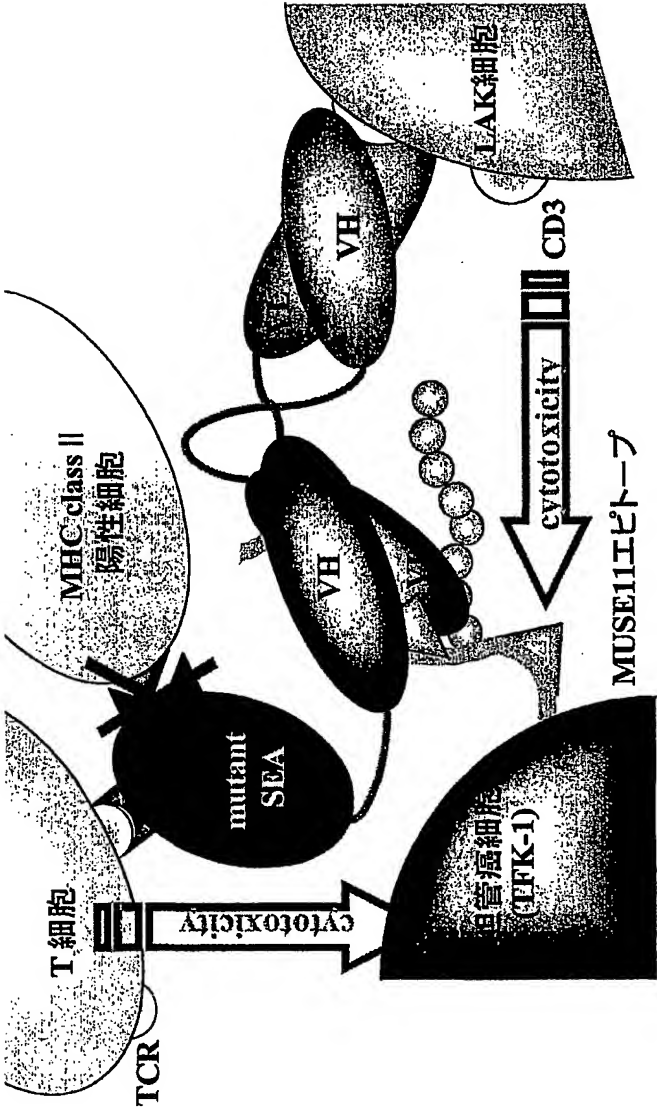


図 2

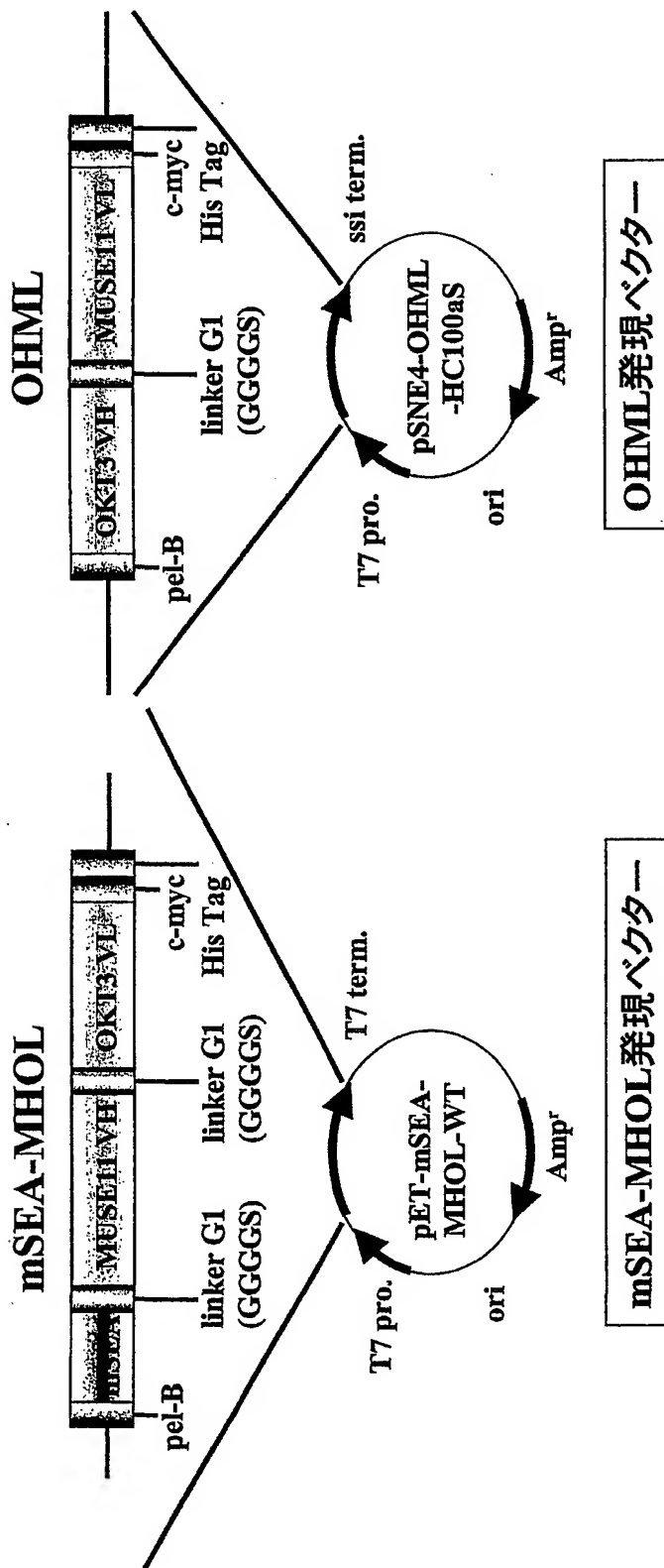


diabodyによる細胞の架橋

図 3



mSEA-diabodyによる細胞の架橋



B

A

ベクター構成

図 5

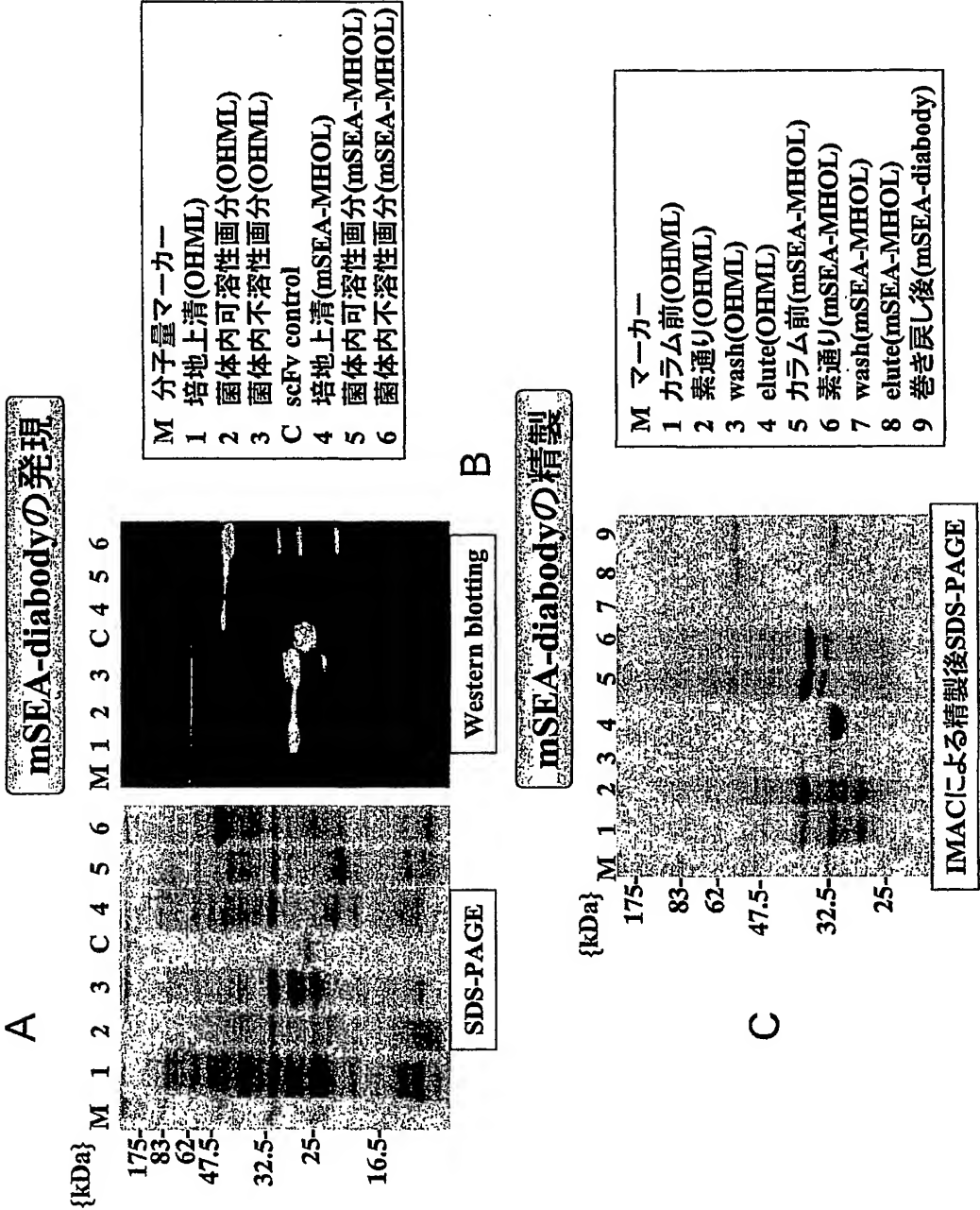
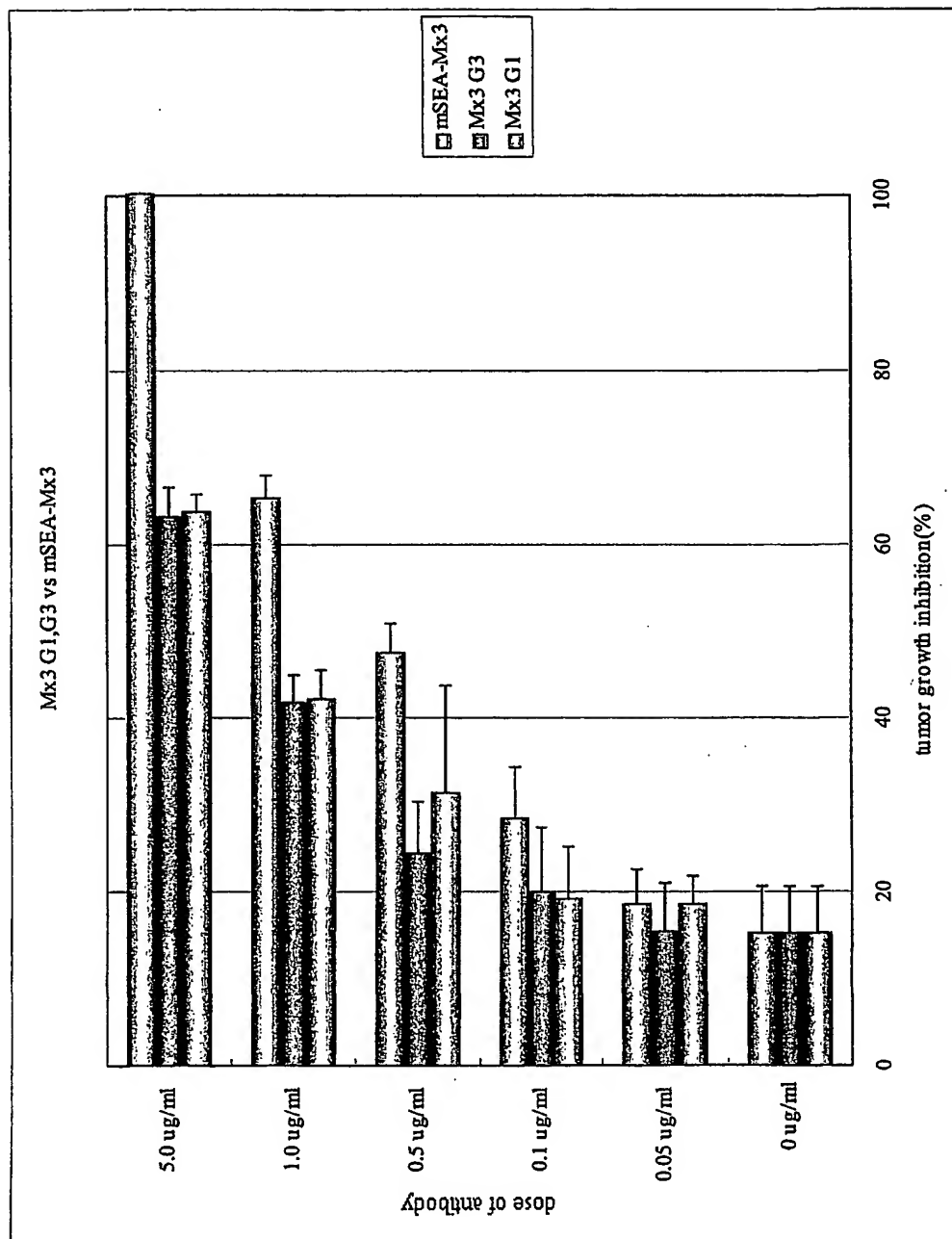
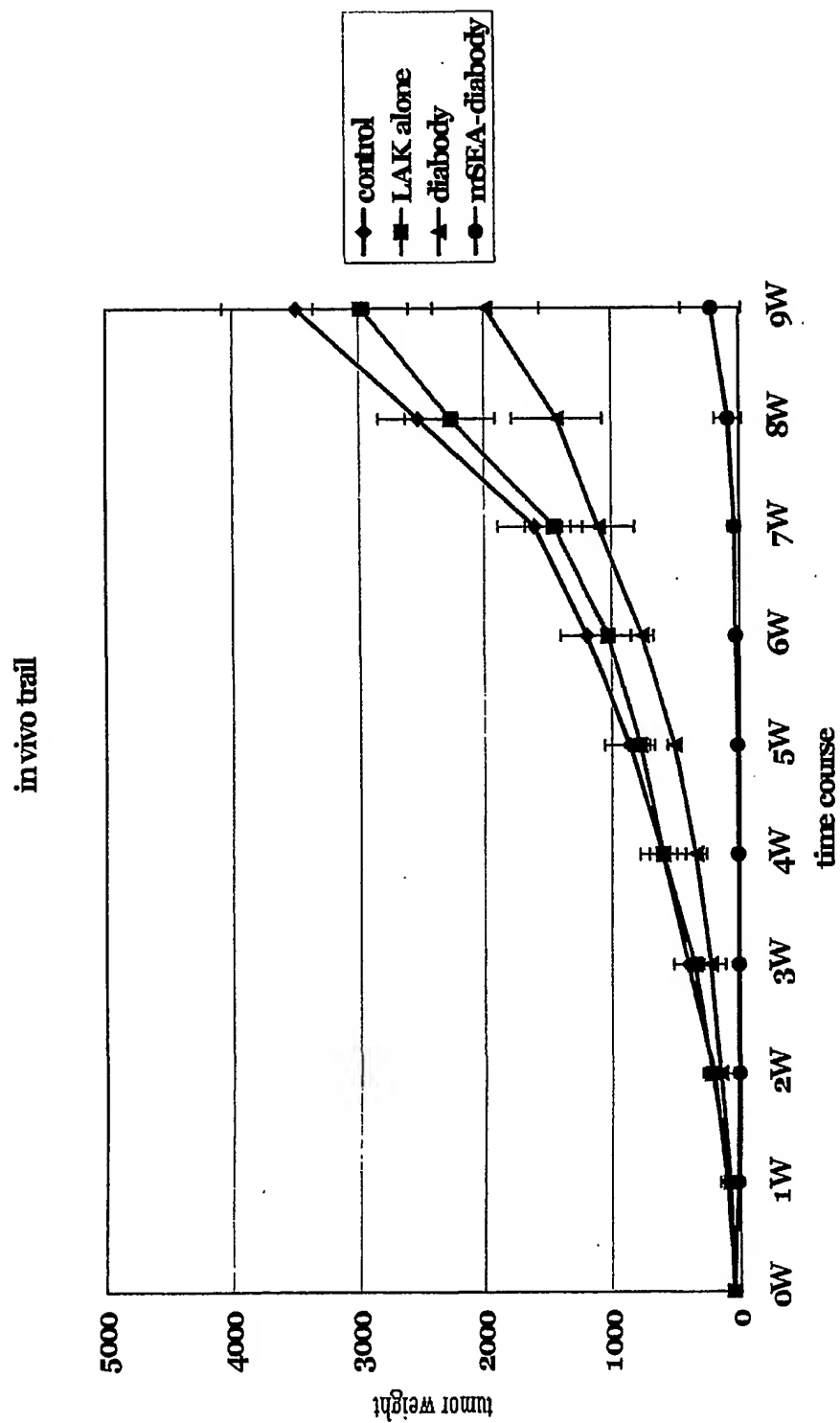


図 6





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/13, C07K16/00, C07K19/00, C12P21/08,
A61P35/00, A61K38/16, A61K48/00 // A61K35/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/13, C07K16/00, C07K19/00, C12P21/08,
A61P35/00, A61K38/16, A61K48/00, A61K35/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Helfrich, W. et al., "Construction and Characterization of a Bispecific diabody for Retargeting T Cell to Human Carcinomas" Int.J.Cancer (1998) Vol. 76, No.2, pp.232-239	1-2,4,11-12, 14-17,19-28
Y		3,5,7-10,13,18
X	Holliger, P. et al."Specific killing of lymphoma cells by cytotoxic T-cells mediated by a bispecific diabody" Protein Engineering (1996), Vol. 9, No. 3, pp.299-305	1-2,4,11-12, 14-17,19-28
Y		3,5,7-10,13,18
Y	Kudo, T. et al., "Retargeting of killer cells with bispecific antibodies greatly enhances MUC1-specific cytotoxicity" Biotherapy (1997), Vol. 11, No. 3, pp.331-333	3,5
Y	Katayose, Y. et al., "MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: Inhibition of Xenografted human bile carcinoma growth" Cancer Res. (1996), Vol. 56, No. 18, pp.4205-4212	3,5
Y	Sakurai N. et al., "SEA-scFV as a bifunctional antibody: Construction of a bacterial expression system and its functional analysis" Biochem. Biophys. Res.	7-9,13,18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
02 October, 2000 (02.10.00)

Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04389

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Commun. (1999), Vol. 256, No. 1, pp.223-230	
Y	Brodin, N. T. et al., "Man-made superantigens: Tumor-selective agents for T-cell-based therapy" Adv. Drug Deliv. Rev. (1998), Vol. 31, Nos. 1-2, pp.131-142	7-10,13,18
A	Kipriyanov, M. S. et al., "Bispecific CD3XCD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cell" Int.J.Cancer (1998), Vol. 77, No. 5, pp.763-772	1-29
A	Nitta, T. et al., "Bispecific F(ab') ₂ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytolysis of human T cells" Eur.J.Immunol. (1989), Vol. 19, No. 8, pp.1437-1441	1-29
A	Kudo, T. et al., "Specific targeting immunotherapy of cancer with bispecific antibodies" Tohoku J. Exp.Med. (1999), Vol. 188, No. 4, pp.275-288	1-29
A	Kudo, T. et al., "Production of MUC1 vaccine cells by transfecting MUC1-cDNA plasmid to EBV-lymphoblastoid cells" Biotherapy (1997), Vol. 11, No. 4, pp.549-555	1-29
A	Asano, R. et al., "Functional Construction of the anti-Mucin Core protein (MUC1) antibody MUSE11 variable regions in a bacterial expression system" J. Biochem. (April 2000), Vol. 127, No. 4, pp.673-679	1-29

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/13, C07K16/00, C07K19/00, C12P21/08,
A61P35/00, A61K38/16, A61K48/00 // A61K35/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/13, C07K16/00, C07K19/00, C12P21/08,
A61P35/00, A61K38/16, A61K48/00, A61K35/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Helfrich, W. et al. "Construction and Characterization of a Bispecific diabody for Retargeting T Cell to Human Carcinomas" Int. J. Cancer (1998) 第76巻 第2号 p. 232-239	1-2, 4, 11-12, 14-17, 19-28 3, 5, 7-10, 13, 18
<u>X</u> Y	Holliger, P. et al. "Specific killing of lymphoma cells by cytotoxic T-cells mediated by a bispecific diabody" Protein Engineering (1996) 第9巻 第3号 p. 299-305	1-2, 4, 11-12, 14-17, 19-28 3, 5, 7-10, 13, 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.10.00

国際調査報告の発送日

10.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kudo, T. et al. "Retargeting of killer cells with bispecific antibodies greatly enhances MUC1-specific cytotoxicity" Biotherapy (1997) 第11巻 第3号 p. 331-333	3, 5
Y	Katayose, Y. et al. "MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: Inhibition of Xenografted human bile carcinoma growth" Cancer Res. (1996) 第56巻 第18号 p. 4205-4212	3, 5
Y	Sakurai N. et al. "SEA-scFV as a bifunctional antibody: Construction of a bacterial expression system and its functional analysis" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999) 第256巻 第1号 p. 223-230	7-9, 13, 18
Y	Brodin, N. T. et al. "Man-made superantigens: Tumor-selective agents for T-cell-based therapy" Adv. Drug Deliv. Rev. (1998) 第31巻 第1-2号 p. 131-142	7-10, 13, 18
A	Kipriyanov, M. S. et al. "Bispecific CD3XCD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cell" Int. J. Cancer (1998) 第77巻 第5号 p. 763-772	1-29
A	Nitta, T. et al. "Bispecific F(ab') ₂ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytotoxicity of human T cells" Eur. J. Immunol. (1989) 第19巻 第8号 p. 1437-1441	1-29
A	Kudo, T. et al. "Specific targeting immunotherapy of cancer with bispecific antibodies" Tohoku J. Exp. Med. (1999) 第188巻 第4号 p. 275-288	1-29
A	Kudo, T. et al. "Production of MUC1 vaccine cells by transfecting MUC1-cDNA plasmid to EBV-lymphoblastoid cells" Biotherapy (1997) 第11巻 第4号 p. 549-555	1-29
A	Asano, R. et al. "Functional Construction of the anti-Mucin Core protein (MUC1) antibody MUSE11 variable regions in a bacterial expression system" J. Biochem. (2000, Apr.) 第127巻 第4号 p. 673-679	1-29